



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y
FUNCIONAL DE LA RESPUESTA A LA ACIDEZ
EN *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*. POSIBLE
ROL EN LA INFECCIÓN PERSISTENTE

Tesista Bioq. Matías Fingermann
Directora Dra. Daniela Hozbor
Año 2011



El presente trabajo de Tesis Doctoral para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, dependiente de la UNLP y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, bajo la dirección de la Dra. Daniela Hozbor.

Agradecimientos:

En estas breves líneas quisiera agradecer a todos los que de una u otra manera han colaborado para que pudiera realizar (....y terminar) este trabajo de tesis. En primer lugar, si bien con un mecanismo absolutamente perfectible, el Estado nacional me ha brindado a lo largo de estos años una indispensable ayuda económica en compensación por mi trabajo. A Dani Hozbor, que ha tenido un rol importante en mi formación profesional desde aquella Argentina en llamas del 2001, por haber hecho un lugar dentro de sus cien mil actividades para dirigir una tesis más, por los mates compartidos y por transmitir siempre sus ganas de ir para adelante. A los Bordetelos por los momentos dentro y fuera del laboratorio, los asados en lo de Bottero, las "batallas" (alguna incluso ganadas) contra el MALDI, los agradables momentos de charla en el clima tropical del flujo.... Pero por sobre todas las cosas por transmitir las ganas de compartir y formar más que un grupo de trabajo, un grupo humano. A Tony, por el interés y la ayuda constante, por las charlas, por buscar siempre una mirada conciliadora ante los roces surgidos de tantas horas entre tanta gente en un lugar que a veces (y no pocas) ha quedado chico. A los RPS y los R3 por la buena onda en el día a día del fondo del IBBM, los festejos nocturnos intra y extramuros y por la voluntad de armar (naturalmente con algunas diferencias) un grupo humano de los tres colectivos de trabajo. A los "becarios", por las ganas de ir para adelante, de tener voz propia, de criticar constructivamente, de ser parte activa en lo que hacen. A Augusto y a los E.V., por contagiar las ganas y el esfuerzo de permitirse soñar y generar otra mirada y otro objetivo, sin los pies en el aire, ni el norte en el ego, ni en el valor agregado, para la ciencia. Al grupo del Dr Perales en el Fiocruz, especialmente a Ana, Rodrigo y "o fuzilero", por el trato más que de amigo, de hermano, por haberme dado de manera totalmente desinteresada una mano fundamental con la proteómica. *Moito obrigado meus caros amigos!*

A mis viejos, mis hermanos, mis amigos y el resto de la flia, por la Paciencia, pero con P mayúscula, entre tanta ausencia, por ayudarme a poner los pies sobre la Tierra de vez en cuando.

Y fundamentalmente a Agus, por la paciencia (esta vez todo en mayúscula), por haber sabido entender el esfuerzo que demandó, por haberme ayudado a mantener ese delgado equilibrio entre no bajar los brazos ni tirar todo al tacho, por lo que no se puede expresar en palabras. Y al Joaco... gracias enano por haber venido, por habernos traído, si bien más responsabilidades con menos sueño, más alegría!

Índice general

Capítulo 1	Objetivos e Introducción	1
	Objetivos del trabajo de Tesis doctoral	2
	Introducción	3
	Enfermedades infecciosas. Definiciones y un poco de historia	3
	Definiciones	3
	Breve historia de las enfermedades infecciosas	4
	Zoonosis. Infección y estrategias de control	7
	Estrategias de control dirigidas a enfermedades zoonóticas, específicamente a zoonosis urbanas	8
	Las Bordetellosis	8
	<i>Bordetella bronchiseptica</i> como patógeno de animales	9
	Infección de humanos, su rol como agente causal de zoonosis	11
	Vacunas como medida de control contra <i>B. bronchiseptica</i>	12
	<i>B. bronchiseptica</i> : Características moleculares y funcionales	13
	Toxinas	15
	Regulación de expresión de los factores de virulencia	18
	Otros mecanismos de regulación sensibles a señales externas	25
	Rol de los cambios de expresión fenotípica en la transmisibilidad y sobrevivencia de <i>B. bronchiseptica</i>	26
	En la transmisibilidad	26
	En la sobrevivencia y persistencia	27
Capítulo 2	Resistencia a la acidez y respuesta ATR en <i>B. bronchiseptica</i>	29
	Introducción	30
	Resultados	31
	Efectos de la acidez en la cinética de crecimiento en <i>B. bronchiseptica</i>	31
	Estimación del pH en el cual observar muerte bacteriana	32
	Búsqueda de la respuesta a la tolerancia a la acidez en <i>B. bronchiseptica</i> :	
	Rol del estado de virulencia de la bacteria	33
	Evaluación de la respuesta ATR de <i>B. bronchiseptica</i> en fase avirulenta	38
	Resumen de resultados y conclusiones	41
Capítulo 3	Caracterización molecular de la adaptación de <i>B. bronchiseptica</i> a la acidez del entorno	42
	Introducción	43
	Resultados	44
	Efectos de la acidez sobre componentes no proteicos propios de la superficie bacteriana	44
	Efectos de la acidez sobre componentes proteicos de <i>B. bronchiseptica</i>	45
	Resolución de los extractos proteicos en geles 2D-PAGE	49
	Algoritmo de análisis comparativo entre los proteomas obtenidos	52
	Análisis cuantitativo de expresión diferencial proteómica para ambas condiciones de incubación	63
	Función biológica de las proteínas identificadas como diferenciables en las condiciones de cultivo estudiadas	70
	Detección de la expresión de Bacterioferritina (Bfr)	79

	Evaluación de rol in vivo del fenotipo resistente a la acidez	80
	Discusión	83
Capítulo 4	Conclusiones generales	86
Capítulo 5	Materiales y Métodos	91
	Medios y condiciones de cultivo	92
	Conservación de cepas y material de partida para cultivos líquidos de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	92
	Cultivos bacterianos para ensayo de respuesta ATR.....	93
	Desafío ácido y evaluación de la sobrevivencia bacteriana.....	93
	Análisis de composición y perfil proteico	94
	Obtención de proteínas totales de <i>B. bronchiseptica</i>	94
	Obtención de fracciones proteicas de <i>B. bronchiseptica</i> para 2D-PAGE....	94
	Obtención de un extracto enriquecido en proteínas citosólicas	95
	Cuantificación de proteínas	95
	Extracto enriquecido en proteínas no-citosólicas.....	95
	Electroforesis unidimensional desnaturante (1D-SDS PAGE).....	96
	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida	97
	Primera dimensión: Isoelectroenfoque.....	97
	Segunda dimensión: electroforesis desnaturante en geles SDS-PAGE .	98
	Tinción de geles y digitalización de imágenes	100
	Digitalización de las imágenes.....	101
	Análisis de imágenes de geles 2D-PAGE	101
	Determinación y obtención de parámetros cuantitativos asociados a los <i>spots</i> proteicos.	101
	Análisis estadístico comparativo	101
	Identificación de proteínas	102
	Escisión y procesamiento de bandas y spots de los geles	102
	Análisis de los digestos por espectrometría de masas UV-MALDI Tof/Tof	103
	Identificación de proteínas a partir de espectros MS y MS/MS	104
	Predicción de localización de proteínas	105
	Extracción y análisis de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos	105
	Extracción de LPS.....	105
	Resolución electroforética de los LPS.....	105
	Construcción, expresión y purificación de proteínas recombinantes	106
	Diseño de cebadores específicos y condiciones de amplificación.....	106
	Clonado de la secuencia amplificada	107
	Purificación del plásmido.....	108
	Expresión de la proteína recombinante rBB4918.....	108
	Purificación de la proteína recombinante rBB4918.....	109
	Ensayos de infección en ratones y obtención de sueros policlonales	110
	Cinética de infección a corto plazo en el modelo murino	110
	Obtención de sueros policlonales	110
	Inmunoblot de proteínas	111
Referencias bibliográficas	1913

Indice de Figuras

Figura 1.1 Peste negra del siglo XIV	5
Figura 1.2 Caso grave de Rinitis Atr6fica.....	10
Figura 1.3 Esquema del sistema BvgAS.....	19
Figura 1.4 Esquema del mecanismo de activaci3n del sistema BvgAS.....	20
Figura 1.5 Variaci3n de la actividad transcripcional de genes característicos de fase por efecto de los agentes moduladores.....	21
Figura 1.6 Esquema de las fases fenotípicas extremas de <i>B. bronchiseptica</i>	22
Figura 2.1 Cinética de crecimiento de <i>B. bronchiseptica</i> en fase virulenta en distintas condiciones de acidez.	31
Figura 2.2 Cinética de muerte de <i>B. bronchiseptica</i> en acidez extrema.	33
Figura 2.3 Esquema de la metodología empleada para el análisis de ATR en <i>B. bronchiseptica</i>	34
Figura 2.4 Análisis de la presencia de la respuesta de tolerancia a la acidez en <i>B. bronchiseptica</i>	35
Figura 2.5 Distribuci3n de las bacterias sobrevivientes al pH de muerte de acuerdo a su fase de virulencia.	36
Figura 2.6 Cinética de muerte de bacterias en fase virulenta provenientes de un cultivo a pH: 7,2 (control o no adaptado) o de un cultivo a pH: 5,50 (adaptado).....	37
Figura 2.7 Efectos en la cinética de muerte por diferencias fenotípicas de fase.....	38
Figura 2.8 Cinética de crecimiento del mutante defectivo en BvgA de <i>B. bronchiseptica</i> en fase avirulenta en medio de cultivo a pH: 7,20 y pH: 5,50.	39
Figura 2.9 Evaluaci3n de la presencia de ATR en mutantes de <i>B. bronchiseptica</i> bloqueados en fase avirulenta.	40
Figura 3.1 Corridas electroforéticas de los LPS de <i>B. bronchiseptica</i> obtenidos a partir de cultivos a pH 7,20 y pH: 5, 50.	44
Figura 3.2 Predicci3n de localizaci3n subcelular de proteínas de <i>B. bronchiseptica</i>	46
Figura 3.3 Comparaci3n de buffers de solubilizaci3n para proteínas no citos6licas mediante electroforesis en geles 1-DE.	46
Figura 3.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%p/v) de diferentes fracciones subcelulares de <i>B. bronchiseptica</i> delta <i>bvgA</i> cultivada en diferentes pH.	47
Figura 3.5 Resoluci3n electroforética uni (1-DE) y bidimensional (2-DE) de FPS de <i>B. bronchiseptica</i> . Efecto de la precipitaci3n con TCA.....	49
Figura 3.6 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas de la fracci3n citos6lica de <i>B. bronchiseptica</i>	50
Figura 3.7 Electroforesis 2D-PAGE de extractos proteicos de <i>B. bronchiseptica</i>	51
Figura 3.8 Procedimiento para la obtenci3n de los geles 2D-PAGE consenso de <i>B. bronchiseptica</i> cultivada en una condici3n de pH.....	52
Figura 3.9 Distribuci3n comparativa de los volúmenes de los <i>spots</i> en los distintos geles 2D PAGE para cada condici3n de pH analizada.....	54
Figura 3.10 Correlaci3n entre los valores de pI te3ricos y experimentales.....	55
Figura 3.11 Correlaci3n entre los pesos moleculares te3ricos y experimentales de las subunidades polipeptídicas.....	56
Figura 3.12 Electroforesis en geles 2D PAGE de las fracciones FPS de <i>B. bronchiseptica</i> Δ <i>bvgA</i>	57

Figura 3.13 Geles 2D-PAGE representativos de FPC de la cepa de <i>B. bronchiseptica</i> $\Delta bvgA$.	59
Figura 3.14 Distribución de frecuencias de los volúmenes relativos de los <i>spots</i> de los geles 2D-PAGE extractos citosólicos y de superficie de <i>B. bronchiseptica</i> .	64
Figura 3.15 Distribución de frecuencias de los volúmenes relativos transformados (valores logarítmicos).	65
Figura 3.16 Electroforesis 2D-PAGE de fracciones FPC y FPS de <i>B. bronchiseptica</i> bloqueada en fase avirulenta. Comparaciones entre distintas condiciones de cultivo.	66
Figura 3.17 Arginino-succinato sintasa y el ciclo de la urea.	73
Figura 3.18 Rol de la actividad ureasa en la homeostasis del pH periplásmico en <i>Helicobacter pylori</i> .	75
Figura 3.19 Inmunoblot empleando como anticuerpo al suero obtenido de ratones inmunizados con la proteínas Bfr de <i>B. bronchiseptica</i> .	80
Figura 3.20 Colonización bacteriana de <i>B. bronchiseptica</i> $\Delta bvgA$ en ratones Balb/C.	81
Figura 3.21 Ensayo de sobrevivencia bacteriana a 72 horas post-infección.	82
Figura 4.1 Representación del ciclo biológico propuesto para <i>B. bronchiseptica</i> .	89

Indice de Tablas

Tabla 1.1 Características genómicas de cepas de referencia de <i>bordetellas clásicas</i>	14
Tabla 2.1 Modificaciones sobre la composición original del medio de cultivo Stainer Scholte.....	31
Tabla 3.1 Identificación de proteínas de las diferentes fracciones proteicas de <i>B. bronchiseptica</i> mediante electroforesis asociada a espectrometría de masa UV-MALDI	48
Tabla 3.2 Identidad de los <i>spots</i> de FPS de <i>B. bronchiseptica</i> señalados en la Figura 3.10	57
Tabla 3.3 Identidad de los <i>spots</i> de FPC de <i>B. bronchiseptica</i> señalados en la Figura 3.11.	59
Tabla 3.4 Diferencias de expresión proteica con valor biológico y significación estadística.....	67
Tabla 5.1 Composición del medio base de Stainer Scholte (SS).....	92
Tabla 5.2 Composición del suplemento stock para medio Stainer Scholte.....	92
Tabla 5.3 Composición del medio sólido Bordet Gengou suplementado con sangre (BGAs).....	93
Tabla 5.4 Composición del buffer fosfato salino (PBS).....	94
Tabla 5.5 Composición de solución stock de buffer Laemmli.....	94
Tabla 5.6 Soluciones empleadas en la extracción y resuspensión de los extractos proteicos.....	95
Tabla 5.7 Composición de los geles empleados en electroforesis unidimensional.	97
Tabla 5.8 Protocolos empleados durante el Isoelectroenfoque de las FPS.....	98
Tabla 5.9 Protocolos empleados durante el Isoelectroenfoque de las FPC.	98
Tabla 5.10 Composición de medios empleados durante la segunda dimensión electroforética.	99
Tabla 5.11 Composición de los geles de separación para los distintos tamaños de geles.	99
Tabla 5.12 Soluciones de coloración empleadas en la tinción de Coomassie convencional.....	100
Tabla 5.13 Soluciones empleadas en tinción de Coomassie coloidal.....	100
Tabla 5.14 Protocolo empleado para la amplificación de la secuencia nucleotídica de rBfr	107
Tabla 5.15 Composición medio Luria Bertani (LB).....	107
Tabla 5.16 Composición del buffer de lisis.....	109
Tabla 5.17 Soluciones empleadas en la detección semicuantitativa de rBfr mediante la técnica de Western-blot.....	111

Capitulo 1

Objetivos e Introducción

Objetivos del trabajo de Tesis doctoral

El presente trabajo de tesis se ha focalizado en el estudio del comportamiento de *Bordetella bronchiseptica* frente a una condición de estrés ambiental como lo es la acidez. La elección de esta temática responde a que este patógeno respiratorio, capaz de inducir un conjunto de enfermedades denominadas bordetellosis, enfrenta y sobrelleva esta condición de estrés durante su ciclo de vida. La capacidad de resistir a a condiciones de acidez podría permitir a *B. bronchiseptica* inducir estadios crónicos de la enfermedad, los cuales garantizan no sólo la sobrevivencia del patógeno dentro del huésped sino posibilitan la continuación de la circulación del mismo dentro de una población. Este estadio de cronicidad constituye por ello un problema para la salud.

La profundización de este conocimiento relacionado a la sobrevivencia de *B. bronchiseptica* en condiciones de estrés, contribuiría a un mejor manejo sanitario de este patógeno, capaz de inducir enfermedades en un amplio rango de huéspedes que incluye al hombre.

En este contexto, en mi trabajo de tesis doctoral he abordado los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación del crecimiento de *B. bronchiseptica* en diferentes condiciones de acidez. Determinación de los valores de pH límite para el crecimiento
- Evaluación de la capacidad *B. bronchiseptica* de desarrollar una respuesta de tolerancia a la acidez (ATR).
- Impacto de los fenotipos virulento y avirulento de *B. bronchiseptica* en el proceso de resistencia/adaptación a la condición de estrés estudiada.
- Identificación de componentes proteicos asociados al proceso de resistencia/adaptación mediante espectrometría de masas del tipo UV-MALDI TOF y TOF/TOF. Análisis proteómico de expresión diferencial 2D-PAGE.
- Análisis y discusión del posible rol de los marcadores de respuesta a la acidificación del medio encontrados sobre el ciclo biológico del patógeno.

Introducción

Las enfermedades denominadas bordetellosis se refieren a patologías respiratorias que son ocasionadas por la bacteria gram negativa *Bordetella bronchiseptica*. Estas enfermedades afectan a una amplia variedad de animales incluido el hombre. Recientemente, diferentes organismos internacionales de salud [Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)], han considerado a las bordetellosis como enfermedades zoonóticas de importancia para la región de las Américas [1]. De manera similar a otras zoonosis, los pacientes inmunodeprimidos representan un grupo de riesgo para estas enfermedades [2-4].

Para una mejor comprensión de nuestro trabajo comenzaré con una descripción de las enfermedades infecciosas en general, para luego abocarme a la descripción particular de la interacción *B. bronchiseptica*-huésped. Estas descripciones no servirán de marco para la discusión de los resultados presentados en los capítulos posteriores.

Enfermedades infecciosas. Definiciones y un poco de historia.

Definiciones

Comenzaremos este trabajo con la inclusión de definiciones de términos que serán empleados repetidamente a lo largo de esta presentación. En primer lugar definiremos a una **enfermedad infecciosa** como la manifestación clínica consecuente a la infección llevada a cabo por microorganismos tan diversos como hongos, bacterias, protozoos, virus e inclusive priones. En cambio, para el caso de las infecciones desencadenadas por agentes patogénicos biológicos de tamaño macroscópico se emplea el término **infestación**.

El desarrollo de una enfermedad infecciosa es consecuencia de las propiedades de **infectividad**, **patogenicidad** y **virulencia** del agente etiológico. El término **infectividad** refiere a la capacidad del microorganismo de invadir y/o multiplicarse en los tejidos del huésped, pudiendo dar lugar o no a la enfermedad. El concepto de **patogenicidad** se refiere a la capacidad de un microorganismo de producir manifestaciones clínicas bajo la forma de enfermedad. La **virulencia** por su parte indica la cuantía o el grado de patogenicidad del agente y normalmente se la relaciona con las dosis de microorganismos o el número de moléculas derivadas del mismo que son necesarios para desencadenar la enfermedad en un tiempo dado [5].

La patogenicidad involucra características intrínsecas de los microorganismos por lo que permite comparar diferentes especies microbianas. La virulencia, por el contrario, es una característica inherente a las diferentes cepas dentro de una misma especie y permite realizar comparaciones intra-especie. Más aún, ésta puede no ser estable dentro de una misma cepa, pudiendo variar tanto en el tiempo como en su descendencia a través de mecanismos tan variados como la presencia de mutaciones, transferencia horizontal de genes, etc.

Es interesante destacar que la patogenicidad no depende únicamente del patógeno, sino que también es función de las propiedades del huésped. Como

ejemplos podemos mencionar a *Clostridium botulinum* y al virus influenza cuyas patogenicidades varían fuertemente con la edad de los huéspedes.

A los microorganismos en función de su patogenicidad se los clasifica como **patógenos verdaderos** y **oportunistas** (o patógenos potenciales) [5].

Los patógenos verdaderos o estrictos tienen la capacidad de producir enfermedad en huéspedes sanos. Se caracterizan en general por proceder de una fuente exógena y necesariamente ser adquiridos por contagio. Su acción patogénica es debida a la expresión de factores de virulencia que producen un cuadro clínico específico y por ello fácil de diagnosticar.

Los patógenos oportunistas o potenciales por su parte, son aquellos capaces de producir enfermedad sólo en presencia de ciertas condiciones favorables como puede ser la disminución en las defensas del huésped. Como ejemplo de patógenos oportunistas podemos mencionar a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, a *Staphylococcus* y estreptococos del grupo D, Bacteroides, virus tales como el Herpesvirus y hongos como *Pneumocystis carinii* o especies del grupo *Candida*, entre otros.

Los patógenos oportunistas se caracterizan por proceder frecuentemente de una fuente endógena (microorganismos de la flora normal o de la flora externa que se han integrado como parte de la flora normal por un período de tiempo antes de desencadenar la enfermedad). La acción patógena de los mismos se evidencia principalmente en condiciones deficitarias del huésped. Cuando estos patógenos inducen una infección secundaria, la sintomatología resultante suele ser atípica y no específica complicando el diagnóstico de la patología.

En relación al huésped y a su rol en la transmisibilidad de las enfermedades, éste puede actuar como **reservorio** o como **portador**. Se define reservorio al huésped del cual el agente infeccioso depende para sobrevivir. Por su parte, al individuo infectado que sin presentar síntomas clínicos de enfermedad puede ser fuente de infección para otras personas, se lo conoce como portador [5-6].

El término vector se emplea para definir al organismo que mediante diseminación, inoculación o ambas, ocasiona la enfermedad. Así, los artrópodos que transmiten agentes infecciosos desde un individuo a otro son designados artrópodos vectores.

Breve historia de las enfermedades infecciosas

Las enfermedades que por su fácil transmisibilidad son denominadas infecto-contagiosas, han impactado y continúan haciéndolo, en la salud pública y en la demografía. En algunos casos han sido incluso responsables de descensos significativos del tamaño de poblaciones, aún en lapsos de tiempo muy breves. De hecho antes del siglo XIX, la aparición súbita de una enfermedad infecto contagiosa frecuentemente devenía en epidemia, adquiriendo ocasionalmente una magnitud severa [7]. Basta recordar a modo de ejemplo la epidemia de peste bubónica del Medioevo (Figura 1.1). Varios historiadores estiman que la cantidad de muertos por esta enfermedad alcanzó un cuarto de la población de Europa y Asia (24 millones de personas) [8].

De acuerdo con diferentes reportes, la mencionada peste apareció en Caffa en el invierno de 1346 a través del contagio por ratas infectadas. Otra versión atribuye la responsabilidad de su aparición a los tártaros, los cuales arrojaban los cadáveres infectados por encima de los muros durante el sitio de esta ciudad. La gente asustada se dispersó, diseminando rápidamente la plaga alrededor del mar Caspio [9]. Desde allí, por el norte, llegó a Rusia y por el este en 1352 a la India y a China. Los italianos que sobrevivieron a la epidemia escaparon por mar hacia Génova. De acuerdo con cronistas de la época la vía de infección fue rata-pulga-hombre, la cual hizo estragos debido a la densidad poblacional. Esta enfermedad infecciosa ocasionó a lo largo de la historia cuatro grandes pandemias: la de Justiniano (541-544 d.C.), que habiéndose iniciado en el Imperio Romano Bizantino produjo una sucesión de 11 oleadas epidémicas en diferentes lugares en un lapso de 200 años; la "muerte negra" (1346-1361), que arribó a Europa proveniente de Asia, arrasando con la población del continente europeo; la "Gran Plaga" en la década de 1660, y finalmente la pandemia que comenzó en Asia en 1855 y se extendió causando un número elevado de muertes en Cantón, Hong Kong y Rusia, llegando a Gran Bretaña en 1900. A la última pandemia, Ogata Masanori la denominó "la peste de las ratas" dado el elevado número de ratas muertas. La peste reinó así en Europa durante trescientos años y culminó por un proceso natural. No hubo ningún descubrimiento médico ni científico, ni avance en la higiene social ni en el mejoramiento en el nivel de vida que explique aquella desaparición.



Figura 1.1. Peste negra del siglo XIV

La ausencia de una definición etiológica certera, sin dudas dificultó el control de este y de otros brotes epidémicos en el medioevo. Esta situación resultaba agravada por el contexto histórico oscurantista que reinaba en aquella época, haciendo que los brotes epidémicos permanecieran sin control en una región por largo tiempo. A menudo los mismos se tornaban endémicos.

Ya en el siglo XVI Girolamo Fracastoro de Verona sugiere en el libro "*De Contagione et contagiosis morbis*" la hipótesis de la transmisibilidad de ciertas enfermedades por medio de un "*contagium vivum*" o sustancia que se transmite y causa la enfermedad. Pero no fue sino hasta la irrupción de la microbiología y la asociación de los microorganismos como causales de enfermedades, que dio comienzo una nueva era en el conocimiento y control de enfermedades. Uno de los primeros hitos se produjo a raíz de observaciones realizadas independientemente por Delafond y Davaine en Francia, y Pollender en Alemania. Estos investigadores pudieron detectar la presencia de microorganismos en sangre de animales enfermos de ántrax [10]. Sin embargo, la asociación de esta presencia como agente etiológico de la enfermedad no fue inmediata. Años más tarde, el bacteriólogo alemán Robert Koch fue quien pudo identificar a la bacteria como causante del ántrax o carbunco. Más tarde logró también

identificar al agente causal de la tuberculosis. El trabajo de Koch consistió en aislar al microorganismo causante de una enfermedad en un cultivo puro, a partir del cual infectaba a animales sanos para poder evaluar si el mismo era capaz de inducir nuevamente la enfermedad. A partir de los animales enfermos, Koch volvía a aislar e identificar el germen comparándolo con el germen original. Estas etapas experimentales sentaron las bases de los denominados “postulados de Koch”. Koch replicó este trabajo en la India, más específicamente en Calcuta donde logró aislar e identificar con éxito al bacilo del cólera.

Otro interesante hallazgo realizado por Koch, fue la detección de cambios morfológicos en los microorganismos en respuesta a alteraciones de su entorno. En particular, evidenció la aparición de unas formas microbiológicas notablemente resistentes a condiciones medioambientales adversas (esporas) a las que adjudicó un rol esencial en la diseminación de los microorganismos.

A finales del siglo XIX, Pasteur al cultivar los microorganismos a una escala mayor también detecta alteraciones en las propiedades de los mismos como consecuencia de los cambios del entorno. Estos hallazgos sentaron las bases para el desarrollo de uno de los procedimientos más antiguos en la producción de vacunas, ya que uno de los cambios evidenciados por Pasteur estaba asociado a la pérdida de la virulencia de los microorganismos (fenómeno denominado atenuación) [10].

Las estrategias de control desarrolladas a partir estos descubrimientos permitieron reducir de manera significativa la incidencia de un número considerable de enfermedades. Por un momento se pensó incluso, que se contaba con las herramientas esenciales para evitar todas las muertes y las hospitalizaciones causadas por enfermedades infecciosas. Lamentablemente esto no sólo no fue así sino que, en las últimas décadas, han aparecido las denominadas enfermedades infecciosas emergentes (EIE) [7]. Algunas de estas son completamente nuevas, careciendo de antecedentes históricos, como el SIDA o la fiebre púrpura brasileña. Otras en cambio, quedan incluidas dentro de las EIE por haber incrementado de manera dramática su incidencia en la población. En el estudio de las EIE suelen diferenciarse causas directamente relacionadas con acciones humanas de fenómenos menos frecuentes, relacionados con cambios intrínsecos a los microorganismos. Como ejemplos del primer grupo podemos mencionar a modificaciones en el desarrollo económico-social y deficiencias en materia de salud pública. En el segundo grupo, uno de los factores que cobran mayor relevancia es el cambio tanto en las propiedades como en la proporción de cepas preexistentes de diferente comportamiento fenotípico. Un ejemplo, frecuentemente mencionado en la literatura de esta situación es el incremento en el número de cepas resistentes a antibióticos acaecido tras la aparición y uso generalizado de los antibióticos.

El conocimiento sobre las enfermedades infecciosas en animales ha seguido un camino evolutivo similar a su contraparte en humanos. En algunos casos la profundización en el estudio de enfermedades en ambos huéspedes ha permitido descubrir un vínculo entre ellas. Sin embargo en comparación con las infecciones en el hombre, la información sobre las enfermedades infecciosas en otros animales es menos abundante. Los datos y el conocimiento sobre estas enfermedades cobran frecuentemente interés y se ven profundizados cuando las mismas tienen una relación directa o indirecta con el hombre. El conocimiento sobre ántrax por ejemplo se

profundizó por su impacto indirecto por inducir una elevada mortalidad del ganado bovino provocando graves pérdidas económicas [10].

Otras enfermedades que también tienen impacto en el hombre pero en forma más directa son las llamadas enfermedades zoonóticas. A continuación me referiré a ellas dado que las bordetelosis causadas por *B. bronchiseptica* son consideradas enfermedades zoonóticas.

Zoonosis. Infección y estrategias de control

Las zoonosis son enfermedades cuyos agentes etiológicos son transmitidos desde otros animales vertebrados al hombre [11]. Ejemplos de enfermedades zoonóticas incluyen a la peste, rabia, tularemia, brucelosis, salmonelosis, bordetelosis y virus del Nilo Occidental. En ocasiones la clasificación de este tipo de enfermedades suele adolecer de límites claros. La malaria, por ejemplo, es habitualmente clasificada como enfermedad zoonótica aunque sea transmitida desde un humano infectado a otro humano a través de picaduras de mosquitos. Estos mosquitos actúan por lo tanto como vectores del agente etiológico *Plasmodium falciparum*. Algunos animales pueden resultar infectados por el parásito, pero sin manifestar sintomatología alguna, actuando como reservorios. Dado que en ocasiones es posible la transmisión del parásito desde el reservorio animal hacia el hombre, esto ha hecho que la enfermedad sea habitualmente considerada y clasificada como zoonosis [6].

El proceso de diseminación de una especie a otra es frecuentemente denominado **cruce de la brecha** entre especies. Toda enfermedad capaz de atravesar esta **brecha** tendrá asociado un potencial zoonótico. Los factores que favorecen la aparición de una enfermedad zoonótica son variados. Entre otros pueden mencionarse al incremento del contacto animal-humano debido a la cría intensificada de animales domésticos, la disminución de la inmunidad en el hombre; modificaciones genofenotípicas en los microorganismos que permiten a patógenos naturales de animales infectar humanos, etc.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 75% aproximadamente de las nuevas enfermedades que han afectado al hombre en los últimos 10 años han sido originadas en animales o productos de origen animal [12]. En el año 2004 la OMS, la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO) y la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) han acuñado la siguiente definición para las zoonosis emergentes: toda zoonosis desconocida, de evolución reciente o anteriormente reconocida pero con un incremento reciente en su tasa de incidencia, expansión geográfica o de rango de huéspedes o vectores [13].

La presencia de una enfermedad animal en un área geográfica (enfermedad enzoótica) con potencial zoonótico, representa un riesgo de desarrollo de brotes con potenciales consecuencias endémicas. Estos brotes, equivalentes a las epidemias en humanos, son denominados epizootias. Muchas de las epizootias ocurridas en el pasado en varias regiones del mundo, han conducido a la aparición de zoonosis cuyas endemias continúan aún en estos días [14]. Los filovirus Margburg y Ebola son ejemplos de agentes causales de estos brotes epidémicos que han causado y causan una alta mortalidad en primates y humanos.

La estrecha relación existente entre la salud animal y la humana marca sin dudas la necesidad de entender mejor la epidemiología teniendo en cuenta el componente epizootiológico, tanto de los animales domésticos como de la fauna

silvestre. La erradicación e incluso el control de las zoonosis revisten un desafío de considerable magnitud ya que las estrategias a emplear implican controlar simultáneamente al patógeno en diferentes nichos.

La brucelosis y la tuberculosis son las zoonosis más importantes de América Latina, con 20 y 7 millones de bovinos inmuno-reactivos a ambos microorganismos, respectivamente [1, 12]. Las pérdidas ocasionadas por ambas enfermedades se estiman en torno a los 100 millones de dólares anuales. La relevancia de estas dos enfermedades evidencia por un lado un alto grado de infectividad de los agentes causales, aunque también denota la falta de programas de control efectivos. En un tercer lugar de importancia relativa se ubica la leptospirosis, la cual si bien está distribuida en toda Latinoamérica, posee una mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales.

Como consecuencia de la actividad productiva de porcinos en áreas urbanas y periurbanas, se ha observado en años recientes un notable aumento en Latinoamérica, de triquinelosis y rinitis atrófica por *Pasteurella multocida* y *B. bronchiseptica*.

Estrategias de control dirigidas a enfermedades zoonóticas, específicamente a zoonosis urbanas

En los últimos años se ha observado una elevada concentración de animales en lugares donde antes no los había o se encontraban en pequeñas proporciones. Este hecho cuando se suma a condiciones de precariedad edilicia, socioeconómicas y culturales incrementa la probabilidad de zoonosis. A estos lugares donde se concentran las fuentes de infección se los suele denominar "microfoco". En general está representado por una pequeña superficie territorial capaz de brindar condiciones ideales para el asentamiento de ejemplares de la especie considerada responsable.

Varias medidas son comúnmente empleadas para combatir y evitar el desarrollo de las zoonosis. El ordenamiento y regularización sanitaria de establecimientos productores de animales para consumo, es una de ellas. Asimismo, la revisión y el control del estado higiénico sanitario de los animales faenados y del medio son medidas altamente recomendadas. Resulta fundamental también evitar la atracción y asentamiento de especies que intervienen tanto directa como indirectamente en el ciclo de transmisión de las enfermedades. Otro aspecto importante en la prevención y control de las zoonosis es la implementación de programas de educación para la Salud dirigidos a docentes, profesionales y población en general. Por último, la vacunación es sin duda una de las medidas de control más efectivas. La aplicación de las anteriores medidas de manera conjunta actuará en forma sinérgica en el control y prevención de brotes epizooticos.

Las Bordetellosis

Como hemos mencionado *B. bronchiseptica* juega un rol preponderante como agente causal de las enfermedades respiratorias conocidas como bordetellosis. Esta bacteria ha sido reconocida como patógeno de varias especies animales y como agente causal de enfermedades zoonóticas [2, 4, 15-17]. A este respecto, en un reporte conjunto de la OMS, la FAO y la OIE del año 2004, las bordetellosis han sido incluidas en la lista de las zoonosis de interés para la región de las Américas [1].

Dentro de las bordetellosis mejor descritas, podemos mencionar como ejemplos a la bronquitis crónica en perros; la rinitis atrófica porcina, la

bronconeumonía supurativa en cerdos [17]. En el hombre produce una enfermedad cuya sintomatología es variable pero en los últimos casos reportados se ha observado sintomatología compatible con la tos convulsa o pertussis, enfermedad causada principalmente por otra especie del género denominada *B. pertussis* [2, 15].

***Bordetella bronchiseptica* como patógeno de animales**

Cánidos

La implicancia de *B. bronchiseptica* en enfermedades del tracto respiratorio de animales fue sugerida por primera vez en 1910, cuando pudo ser aislada en perros con moquillo. En ese entonces recibió el nombre de *Bacillus bronchicanis* [18]. Sin embargo, gracias al desarrollo de la microbiología y la clínica veterinaria, se pudo concluir más tarde que esta enfermedad poseía una etiología viral y no bacteriana [17]. Cinco décadas después, la bacteria para ese entonces denominada *Brucella bronchiseptica*, fue identificada como uno de los posibles agentes causales de una forma de traqueobronquitis canina. Esta enfermedad es comúnmente denominada "tos de los caniles" [2, 17, 19]. Posteriormente pudo establecerse que además de *B. bronchiseptica* otros agentes (Adenovirus tipo 2 y el virus de Parainfluenza) pueden ocasionar la enfermedad y en caso de una infección mixta pueden agravarla.

En general *B. bronchiseptica* actúa como patógeno oportunista del tracto respiratorio superior aunque es sabido que puede ocasionar una infección primaria. Una vez adherida a la superficie ciliar del epitelio respiratorio, *B. bronchiseptica* ocasiona la parálisis ciliar e induce una congestión de la mucosa traqueal y bronquial con la presencia de un exudado mucopurulento [15]. Los perros severamente afectados suelen manifestar una tos seca, ronca, en ocasiones seguida de vómito, pudiendo el síndrome durar de 1 a 2 semanas. En los casos más graves, la enfermedad puede derivar en una neumonía seguida de muerte del animal [17]. Una de las complicaciones habituales suele ser la pérdida de apetito y consecuentemente una disminución sustancial del peso.

Los animales más susceptibles a contraer "la tos de las perreras" son los neonatos, principalmente durante el período inmediato posterior al destete. Los adultos normalmente afectados son aquellos individuos débiles, convalecientes de alguna enfermedad, o inmunosuprimidos por tratamientos prolongados con esteroides u otros medicamentos.

Los primeros signos clínicos (tos en los perros) aparecen entre 3 y 10 días posteriores a la infección, y pueden persistir durante un período de 3 a 6 semanas [20]. El patógeno puede recuperarse viable de las tráqueas de los animales infectados durante al menos las 14 semanas posteriores a producida la infección [21]. Durante el período de comunicabilidad, el hombre puede infectarse. La mayoría de los casos en humanos está asociada a un historial de tratamientos inmunosupresivos.

Felinos

B. bronchiseptica es un reconocido agente etiológico de enfermedades del tracto respiratorio de felinos [17]. Los signos y síntomas clínicos de las bordetellosis en estos animales incluyen fiebre, tos, estornudos, descargas oculares y linfadenopatía, los cuales suelen resolverse en alrededor de 10 días [22]. En el pasado, esta enfermedad era atribuida a otros agentes causales como *Calicivirus felino* (FCV), Herpesvirus felino (FHV) y *Chlamydomphila felis*. Recientemente Jacobs y col fueron

capaces de demostrar el rol de *B. bronchiseptica* como patógeno primario del aparato respiratorio de gatos [23]. En el trabajo mencionado, gatos de 8 semanas de vida, libres de FHV, FCV y *Chlamydomypha felis* fueron desafiados con aerosoles de *B. bronchiseptica* en solución salina. Al cabo de 5 días de realizada la infección, los gatos desafiados desarrollaron síntomas de enfermedad respiratoria. Los síntomas se mantuvieron presentes durante 10 días, tras lo cual comenzaron a remitir. El aspecto más alarmante de la infección por *B. bronchiseptica*, es la gran cantidad de muertes que induce sobre todo entre gatos jóvenes para los cuales la enfermedad suele progresar con rapidez hasta transformarse en una bronconeumonía.

Al igual que lo observado en perros, la bordetellosis felina es una enfermedad altamente contagiosa, para la cual las condiciones de confinamiento actúan como factores facilitadores de la transmisión.

En un trabajo epizootiológico realizado en nueve países europeos, en hogares con más de cinco gatos, se detectó que en 5% de los hogares con enfermedad declarada y en 1,3% de los hogares sin enfermedad *B. bronchiseptica* estaba presente [22].

Porcinos

Las infecciones por *B. bronchiseptica* en porcinos han sido las más estudiadas posiblemente a raíz de las pérdidas económicas que conllevan [17, 24-27]. Ya en los finales de la década de 1960 era aceptado el rol de *B. bronchiseptica* como patógeno primario de la denominada rinitis atrófica (RA) porcina [2, 17]. Esta enfermedad afecta principalmente los cornetes nasales de lechones, observándose una hiperplasia del epitelio nasal con ocasional metaplasia e infiltración de neutrófilos. En los casos más graves puede observarse una deformación sustancial del hocico del cerdo (Figura 1.2) [15, 17, 28].

La hipótesis que consideraba un rol de *B. bronchiseptica* como agente primario no permitía sin embargo, explicar algunas observaciones experimentales tales como la baja proporción de animales enfermos respecto de los portadores, la baja eficacia de vacunas específicas contra *B. bronchiseptica* y la necesidad de inoculación continua para el mantenimiento de los síntomas [17, 29]. Estos hechos experimentales pudieron ser explicados cuando finalmente pudo aislarse e identificarse como agente causal de rinitis atrófica a *Pasteurella multocida*. En los casos más graves e irreversibles de la enfermedad es donde se detecta la coinfección con *B. bronchiseptica* y *P. multocida*. Actualmente se considera que *B. bronchiseptica* tiene un rol como agente predisponente para la sobreinfección por *P. multocida*, la cual sería la responsable de los signos clínicos más graves [28]. Adicionalmente *B. bronchiseptica* es considerada



Figura 1.2 Caso grave de Rinitis Atrófica.

En la figura puede observarse una marcada distorsión del septo nasal, característica distintiva de la Rinitis Atrófica grave en estadios avanzados.

patógeno secundario de varias enfermedades respiratorias, con implicancias negativas en el sector productivo [2, 17, 27-28, 30]. Así el denominado Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas caracterizado por la presencia de tos, fiebre y dispnea sobre todo en cerdos de entre 16 y 22 semanas de edad, produce una baja tasa de crecimiento y/o anorexia que puede llevar a pérdidas económicas importantes para los productores [31]. Se han descrito al menos 5 especies virales y 8 bacterianas como los responsables de dichas enfermedades [30-31]. Las infecciones por *B. bronchiseptica* en este complejo de enfermedades se encuentran frecuentemente asociadas a las causadas por *P. multocida*, *M. hyopneumoniae* y/o Streptococcus α -hemolíticos, produciendo signos clínicos de neumonía [30].

La alta prevalencia de *B. bronchiseptica* en cerdos sin dudas favorece la infección por otros patógenos. En ensayos de infección de animales se ha podido observar un efecto beneficioso de la primo-infección por *B. bronchiseptica* a superinfecciones inducidas por patógenos del sistema respiratorio como el *Haemophilus parasuis* [32], Coronavirus respiratorio porcino (PRCV) [33] y Virus reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) [34], además de la ya mencionada *P. multocida* [28]. Teniendo en consideración los enunciados anteriores podemos concluir por lo tanto, que la infección persistente de porcinos e incluso el estadio portador en estos animales, representa una situación de riesgo a sobre-infecciones por otros patógenos.

Roedores

Los roedores, algunos de los cuales se emplean en el laboratorio como modelo experimental de infección por *B. bronchiseptica*, son huéspedes naturales de este microorganismo [35-38].

Del mismo modo que lo ocurrido en la rinitis atrófica de porcinos, *B. bronchiseptica* fue inicialmente aceptada como el agente etiológico primario de enfermedades como moquillo, otitis media, bronquitis traqueal y bronconeumonía [17, 37]. Sin embargo, recientemente se le ha asignado un rol principal en el desarrollo de estas patologías a la presencia de *P. multocida*, relegando a *B. bronchiseptica* el rol de agente predisponente o patógeno oportunista [2].

En el caso de ratas y ratones, la mayoría de los registros provienen de experimentaciones en el laboratorio [35, 39-40]. En ambos roedores su inoculación con cultivos puros del patógeno produce signos y síntomas de enfermedad respiratoria. No obstante, al cabo de un lapso de tiempo, puede producirse la remisión y desaparición de los signos clínicos de la enfermedad, arribando a un período de portación asintomática capaz de durar toda la vida del animal [35, 38].

Infección de humanos, su rol como agente causal de zoonosis

El rol de *B. bronchiseptica* como microorganismo comensal e inclusive como patógeno en humanos ha sido objeto de extenso debate. Dos décadas atrás, en 1991, Woolfrey y Moody realizaron una amplia revisión bibliográfica de los trabajos publicados por diferentes autores sobre la infección de esta bacteria en el hombre [2]. Los autores analizaron las publicaciones realizadas durante un período de 80 años hasta esa fecha [41-59]. Si bien son pocos los reportes de aislamientos de *B. bronchiseptica* en el hombre los autores describen 23 casos, 21 descritos en trabajos experimentales ajenos y 2 provenientes de sus propios trabajos. Del total de casos

analizados el 75% de los individuos infectados había estado en contacto con animales infectados.

Se han registrado casos también en pacientes inmunodeprimidos o en los que presentan una patología de base. Así se ha detectado la presencia de *B. bronchiseptica* en pacientes con SIDA [3, 15, 60-61] o con fibrosis quística [4, 15]. La terapia inmunosupresora relacionada a trasplantes [4, 62-65] y la vinculada al tratamiento de procesos malignos [2, 4] representan situaciones de riesgo de infección por este patógeno.

Estudios posteriores mostraron que *B. bronchiseptica* puede colonizar de manera efectiva el tracto respiratorio de humanos, aunque con una incidencia menor a la observada en otros animales [2, 4, 15]. Varios reportes han detectado la transmisión de la bacteria desde huéspedes animales al hombre [2, 4, 66-67] e incluso se han reportado casos con transmisión de humano a humano [2, 63]. La sintomatología que se presenta en el hombre es similar a la tos convulsa, una enfermedad respiratoria causada por un patógeno íntimamente relacionado, *B. pertussis* [2, 15, 66-67]. Los cuadros clínicos más graves como las neumonías han sido registrados en niños pequeños [68].

En general las infecciones causadas por *B. bronchiseptica* se caracterizan por su tendencia a la cronicidad, es decir la persistencia del patógeno dentro del huésped durante largos períodos de tiempo [15, 66-68].

Aunque la incidencia de las infecciones por *B. bronchiseptica* en humanos respecto a otros mamíferos es menor, la vigilancia y el control de este patógeno debe intensificarse sobre todo para los pacientes inmunocomprometidos con alto riesgos de presentar zoonosis [3, 61].

Vacunas como medida de control contra *B. bronchiseptica*

En los primeros estudios sobre la interacción patógeno-huésped se pudo observar que la primera infección por *B. bronchiseptica* es capaz de inducir en el huésped una respuesta inmune protectora [17, 37, 69-70]. Esta respuesta resulta efectiva en la eliminación del microorganismo del aparato respiratorio inferior pero no de la cavidad nasal [35, 40, 71]. Esto podría explicar al menos en parte la elevada prevalencia del estado portador asintomático en varios mamíferos [2, 17, 22, 35, 37, 69, 72].

Se han desarrollado diversas formulaciones a partir del microorganismo entero o sus sub-fracciones con el objetivo de ser aplicadas como vacunas a diferentes especies animales aunque todavía no para uso humano. El diseño de estas formulaciones veterinarias ha perseguido como objetivo final el control de las formas severas de las enfermedades ocasionadas por este patógeno [17, 20, 22, 69, 72-78]. Estas formulaciones a veces contienen otros inmunógenos derivados de los otros patógenos que se encuentran asociados con las infecciones causadas por *B. bronchiseptica*.

Para el control de la tos de los caniles se emplean formulaciones celulares de *B. bronchiseptica* inactivada (vacunas celulares) o también las constituidas por componentes bacterianos proteicos purificados (vacunas acelulares). La efectividad de estas formulaciones en general es baja por ello su empleo no se ha difundido ampliamente [78].

Para los porcinos se han evaluado tanto formulaciones celulares como acelulares, algunas de ellas resultando efectivas frente a la manifestación de signos graves de enfermedad [17, 77]. Sin embargo, la efectividad en la prevención de la colonización de la cavidad nasal por *B. bronchiseptica* por parte de estas vacunas ha resultado ser variable, dependiendo principalmente del tipo de formulación vacunal empleada. Las vacunas atenuadas han demostrado ser en general superiores a las formulaciones anteriormente mencionadas, sobre todo en lo que se refiere a la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio superior [69, 72-73, 76-79]. Estas formulaciones han sido probadas con éxito en diferentes animales de laboratorio (ratones y conejillos de indias) [79-82] e incluso algunas se encuentran actualmente disponibles comercialmente para su empleo en perros, gatos [20, 83-84] y cerdos [69, 85]. El éxito de este tipo de vacunas parece deberse a la respuesta inmune local inducida luego de su aplicación directa sobre la mucosa nasal de los animales. Se ha observado incluso que esta respuesta es similar a la inducida por la infección natural por el patógeno [69, 72, 79]. Estas formulaciones sin embargo, representan un riesgo tanto para el individuo vacunado como para individuos susceptibles. De hecho se ha observado en algunas ocasiones que la cepa atenuada es capaz de colonizar durante largos períodos de tiempo el tracto respiratorio de los animales vacunados, lo cual podría favorecer la transmisibilidad de la cepa atenuada. Los riesgos de presentar efectos adversos a consecuencia de la exposición frente a cepas atenuadas serán máximos para individuos con algún factor de compromiso, siendo un ejemplo frecuente de esto la presencia de inmunodepresión adquirida o inducida. Existen ejemplos en la literatura de pacientes que fueron sometidos a terapia inmunosupresora y que se han infectado por exposición frente a perros vacunados con cepas atenuadas de *B. bronchiseptica* [64]. Un aspecto poco estudiado pero que merece atención es el relacionado a las consecuencias de la interacción de las cepas atenuadas con otros patógenos del tracto respiratorio como pueden ser el *Haemophilus parasuis* [32], Coronavirus respiratorio porcino (PRCV) [33], Virus reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) [34] y *P. multocida* [28].

En suma, las distintas vacunas en uso han reducido la incidencia de las enfermedades causadas por *B. bronchiseptica* sin embargo es clara la evidencia que muestra la necesidad de su mejora. En este sentido, los nuevos diseños deberían focalizarse también hacia el control de la transmisión del patógeno y del desarrollo de zoonosis.

***B. bronchiseptica*: Características moleculares y funcionales**

B. bronchiseptica es una de las nueve especies que componen el género *Bordetella*, perteneciente a las β -proteobacterias, familia Alcaligenaceae. Por su relevancia como patógenos respiratorios de mamíferos, tres integrantes del género conforman el grupo de las denominadas *Bordetellas clásicas*: *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* [15, 86]. Estas tres especies pueden describirse microscópicamente como cocobacilos gram negativos polimórficos con características antigénicas muy similares [86]. Ninguna de ellas emplea a los hidratos de carbono como fuente de carbono y energía. Sin embargo, *B. bronchiseptica* se diferencia del resto de los miembros del grupo de *Bordetellas clásicas* por presentar menores

requisitos nutricionales y una mayor velocidad de crecimiento en iguales condiciones de cultivo [17, 86].

A pesar de poseer un rango de huéspedes diferente, las tres especies del grupo de *Bordetellas clásicas* inician sus procesos infectivos uniéndose al epitelio ciliado de la tráquea ocasionado ciliostasis [2, 86-87]. En el caso de *B. bronchiseptica* se ha podido observar que el pulmón infectado presenta una inflamación perivascular y peribronquial generalizada, con un gran número de células infiltradas entre las que predominan los granulocitos polimorfonucleares [35, 40, 88]. En algunas áreas del pulmón se observan incluso signos de franco proceso necrótico [35]. Luego de este período agudo de la infección, *B. bronchiseptica*, de manera diferencial al grupo, induce estadios crónicos de infección posiblemente como consecuencia de invadir y sobrevivir células epiteliales [89-91] y fagocíticas [36, 92-97].

El secuenciamiento de los genomas de las tres especies ha permitido profundizar en algunos aspectos relativos a la evolución y diferenciación dentro del grupo de las *Bordetellas clásicas* [86, 98]. En la Tabla 1.1 se presentan las características más sobresalientes de los genomas de las tres especies integrantes del grupo.

Tabla 1.1. Características genómicas de cepas de referencia de las Bordetellas clásicas

Propiedades	<i>B. pertussis</i> Tohama fase I	<i>B. parapertussis</i> 12822	<i>B. bronchiseptica</i> RB50
Tamaño de genoma (pb)	4.086.186	4.773.551	5.338.400
Número predecible de genes	3.816	4.404	5.007
Número de pseudogenes (% secuencias codificantes)	358 (9,4%)	220 (5,0%)	18 (0,4%)
Contenido en G+C (%)	67,72	68,10	68,07
Secuencias de Inserción (número de copias)	IS481 (238) IS1002 (6) IS1663 (17)	IS1001 (22) IS1002 (90)	Ninguna

Varios estudios han propuesto la existencia de un ancestro común para las tres especies el cual sería más próximo *B. bronchiseptica* [98-101]. A partir de este antecesor común, las tres especies habrían evolucionado a través de un proceso caracterizado principalmente por la pérdida de material genético. Una de las consecuencias de este mecanismo evolutivo sería la restricción en el rango de huéspedes para *B. parapertussis* y *B. pertussis* [98, 102].

Se ha estimado que *B. bronchiseptica* se habría separado de sus congéneres entre 1,1 y 5,5 millones de años atrás mientras que *B. pertussis* se habría diferenciado a partir de este último grupo alrededor de 0,3 y 2,5 millones de años atrás [101].

Más allá de estas diferencias evolutivas, las tres especies comparten una serie de factores bacterianos que son esenciales para la colonización y la patogénesis bacteriana. Entre estos factores se pueden mencionar a las adhesinas y toxinas

A continuación describiré las principales características de las adhesinas y toxinas de *B. bronchiseptica* por ser esta especie objeto de este trabajo.

Adhesinas

La Hemaglutinina filamentosa (FHA) es una proteína de 240 kDa con una estructura filamentosa de 2 nm de diámetro y 45-50 nm de longitud, organizada estructuralmente en 19 hojas β -plegadas que forman una estructura del tipo barril- β que atraviesa la membrana externa de la bacteria [103]. Esta adhesina además de encontrarse asociada a la superficie de la bacteria, es liberada al espacio extracelular. Posee varios dominios responsables de su acción como adhesina. Entre los residuos 1141 y 1279 de FHA se encuentra codificado un dominio tipo lectina denominado CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*). Este posee una afinidad particular por carbohidratos y glicolípidos de células ciliadas y macrófagos. Entre los aminoácidos 442-863 se encuentra un dominio a través del cual puede unirse a heparina y glicolípidos sulfatados no cargados. Finalmente, posee un dominio RGD compuesto por el triplete arginina (R) - glicina (G) - aspártico (D) que participa en la unión a receptores de la familia de las integrinas, presentes en la superficie de macrófagos alveolares y células ciliadas del epitelio respiratorio.

La Pertactina (Prn) es una proteína autotransportadora presente en la membrana externa de *B. bronchiseptica* que, al igual que la FHA, participa en el proceso de adhesión de la bacteria al huésped. A pesar de estar presente en las tres especies del grupo, el peso molecular de la Prn es levemente diferente en cada una de ellas: 68 kDa en *B. bronchiseptica*, 69 kDa en *B. pertussis* y 70 kDa en *B. paraptussis*. Al igual que otras proteínas autotransportadoras, la Prn es inicialmente secretada al espacio periplásmico por un mecanismo dependiente de una secuencia denominada Sec. Posteriormente es procesada mediante un clivaje autocatalítico sobre su extremo C-terminal. Esta proteína así anclada en la membrana juega un rol esencial en el inicio de la colonización de la cavidad nasal. En el pulmón y tráquea, Prn pareciera no tener un efecto significativo sobre la colonización de estas regiones hasta la cuarta semana desde el inicio del proceso infeccioso [104].

Las fimbrias (Fim) o aglutinógenos son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden desde la superficie bacteriana y participan en la adhesión del patógeno. Se encuentran formadas por dos tipos de subunidades denominadas mayores y menores. *B. bronchiseptica* presenta en su genoma al menos cuatro tipos diferentes de genes codificantes de fimbrias: *fim2*, *fim3*, *fimX* y *fimA* [105]. Los productos de estos genes son ensamblados y secretados a través de un único sistema, codificado por el locus *fimBCD*. Las secuencias codificantes de las distintas subunidades de las Fim y el locus *fimBCD* no son contiguos dentro del cromosoma de esta bacteria. Más aún, el locus *fimBCD* se encuentra dentro del operón FHA, lo cual sugiere un carácter co-transcripcional [106]. La delección del locus *fimBCD* ha demostrado impedir la expresión en la membrana bacteriana de todos los tipos de fimbrias. Esto trae aparejado una disminución en la colonización bacteriana de tráquea de ratas [105].

Toxinas

Dentro de las toxinas más estudiadas en *B. bronchiseptica* se puede mencionar a las siguientes:

La Adenilato ciclasa-hemolisina (AC-Hly) es una proteína bifuncional secretada por todas las especies de *Bordetella* que infectan mamíferos [15, 107]. Pertenece a la familia de citotoxinas formadoras de poro y dependientes de calcio. Se trata de una proteína RTX por repeticiones en toxinas. Estas toxinas contienen un arreglo de

repeticiones en tándem de 9 aminoácidos (L-X-G-G-X-G (N/D)-D-X) que están involucrados en la unión a calcio. La AC-Hly se caracteriza por ser expresada sólo en el estado virulento de la bacteria y por ello es habitualmente empleada como marcador de la fase virulenta de la bacteria [17, 108]. Esta proteína es codificada por el gen *cyaA*, el cual forma parte del operón *cyaABDE* cuyos productos génicos están involucrados en la secreción y activación de la toxina [109-111]. La secreción de la toxina sólo ocurre cuando se expresan los genes *cyaB*, *cyaD* y *cyaE*. La expresión del gen *cyaC*, el cual está localizado adyacente al operón *cyaABDE*, es necesaria para la activación de la AC-Hly. CyaC cataliza la adición de ácido palmítico en un residuo interno de lisina (Lys983) [112-113].

La AC-Hly es sintetizada como una pro-toxina monomérica de 1706 aminoácidos [110]. Su actividad adenilato ciclasa se encuentra localizada en los primeros 400 aminoácidos del extremo N – terminal y requiriendo para su activación la unión a calmodulina [110, 114-115]. Los 1300 aminoácidos restantes forman el dominio hemolisina, capaz de formar canales selectivos en las membranas de los eritrocitos desencadenando así su hemólisis. Este dominio es responsable también de la adhesión e internalización de la toxina dentro de la célula eucariota [116].

El ingreso de la toxina a la célula huésped podría describirse como un proceso de tres etapas: inserción, translocación y clivaje. En la inserción la toxina es integrada a la membrana plasmática, posiblemente a través de gangliósidos presentes en la superficie de la célula eucariota [117-118]. Para que este proceso sea exitoso es necesaria la modificación transcripcional realizada por CyaC y la integridad de la región C-terminal. Una vez dentro de la célula, la AC-Hly es clivada por una proteasa intracelular, liberando de esta forma el dominio catalítico con actividad ciclasa. Este último es posteriormente activado como consecuencia de su unión a la calmodulina, comenzando así la producción de cantidades supra fisiológicas de AMPc [114]. Este aumento en la concentración de segundos mensajeros interfiere en la fisiología celular. En particular en el caso de células dendríticas, el aumento de AMPc interfiere en el proceso de diferenciación a células maduras [119-120] mientras que en macrófagos, por su parte desencadena procesos citotóxicos y apoptóticos [121].

Por otra parte se ha podido demostrar que la AC-Hly juega un rol importante en la colonización de la porción inferior del tracto respiratorio, teniendo un papel menos relevante en la cavidad nasal [79].

La Toxina dermonecrótica (TDN) es una toxina de 140 kDa con una ubicación citoplasmática, termolábil que se inactiva al exponerla a 56 °C durante 10 minutos. El nombre de esta toxina se origina de las lesiones necróticas observadas en ratones y otros animales de laboratorio luego de su inoculación intradérmica. En dosis bajas cuando es administrada en forma intravenosa puede ser letal [107]. En estudios *in vitro* se ha observado que la TDN purificada tiene la capacidad de inducir en las células eucarióticas un aumento en la replicación del ADN, de la síntesis proteica y del ensamblaje de las fibras de actina, dando como resultado un aumento en la división celular [15]. Estos cambios se deben a la acción de la toxina sobre la GTPasa Rho un regulador global de la organización del citoesqueleto de actina. La TDN, al mantener permanentemente a las GTPasas en su forma activa, modifica los procesos de migración, morfogénesis y fagocitosis de la célula eucariota.

Hasta el momento, es escaso el conocimiento con respecto al rol de la TDN en la patogénesis de las distintas especies del género. No parece desempeñar un papel

importante en la colonización [122], aunque si es responsable de los daños óseos en los cornetes nasales característicos de la rinitis atrófica en cerdos [123].

El Lipopolisacárido (LPS) y la Citotoxina traqueal (TCT) son toxinas derivadas de componentes estructurales de las membranas de la bacteria. TCT posee un importante efecto ciliostático y descamativo sobre el epitelio ciliado del huésped. Esta toxina en concentraciones altas puede inducir efectos deletéreos sobre neutrófilos [28].

El LPS constituye el componente estructural mayoritario de las membranas externas de las bacterias Gram negativas. La fracción de LPS representa entre un 10-15% del total de moléculas presentes en la membrana externa y se estima que ocupa un 75% de la superficie bacteriana.

El LPS es una molécula anfifílica formada por el lípido A, a través del cual se inserta en la membrana plasmática externa de la bacteria, un core o núcleo de naturaleza oligosacárida y un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O.

Todas las especies de *Bordetella* expresan diferentes moléculas de LPS, hecho que sugiere que este factor jugaría un rol fundamental en la especificidad de especie presentada dentro del género. *B. bronchiseptica* es la única dentro de las *Bordetellas* clásicas que posee un lípido A hexa-acilado mientras que en el resto de las especies se presenta penta-acilado. Esta disposición, similar a lo observado en otras bacterias Gram negativas como *E. coli*, es característico de lípidos A que ocasionan respuestas potentes [124-125].

Cuando se someten los LPS a corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida se puede observar una banda denominada B, compuesta por el lípido A y el core interno, y una banda A. La banda A está compuesta por la estructura de la banda B sustituida por un trisacárido formado por N-acetil-N-metil-fucosamina (FucNAcMe), ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetilmanosaminurónico (2,3-diNAcManA) y N-acetilglucosamina (GlcNAc). El antígeno O de *B. bronchiseptica* es un homopolímero de ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetil-galactosaminurónico [126-127].

A diferencia de los componentes proteicos del género *Bordetella*, el rol del LPS en la patogénesis y en la protección de la enfermedad comenzó a estudiarse en profundidad tardíamente [128-131]. El conocimiento actual de las funciones que cumpliría el LPS a lo largo del proceso infeccioso de *Bordetella* parece indicar que esta molécula tiene una participación compleja en la patogénesis del microorganismo. El LPS actúa produciendo efectos mitogénicos y tóxicos. En ensayos de infección realizados sobre el modelo murino con mutantes defectivos en distintas estructuras del LPS, se ha podido observar una capacidad disminuida en la colonización de tráquea y pulmones, así como en la persistencia de la bacteria [15]. La ausencia de la mayor parte de las estructuras glicosídicas del LPS no permitiría la efectiva colonización del huésped, probablemente debido a la disminución en la capacidad de adhesión de la bacteria sobre células del epitelio respiratorio [129, 132].

Estudios recientes han revelado la importancia de la respuesta al LPS via los receptores Toll-like 4 (TLR 4) en la eliminación de la bacteria del huésped. La infección por *B. bronchiseptica* de ratones defectivos en el receptor TLR-4 tiene graves efectos sobre estos pudiendo incluso resultar letal aún en bajas dosis [125, 129, 133].

El Sistema de secreción tipo tres (TTSS) desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas y ha sido identificado en una gran

variedad de patógenos de humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia* [134]. La maquinaria de secreción está conservada entre los diferentes patógenos, sin embargo las proteínas secretadas difieren, por lo que el mismo mecanismo de transporte puede generar una amplia gama de enfermedades. A través de este sistema la bacteria puede transferir determinantes de virulencia directamente al interior de la célula susceptible mediante una estructura similar a una aguja de inyección [135]. Este proceso es inducido por el contacto de la bacteria con la superficie de la célula blanco a través de mecanismos aún no del todo caracterizados. Las proteínas liberadas a través de este sistema alteran la fisiología normal de la célula eucariota, dando como resultado cambios que le permiten a la bacteria, por ejemplo, evadir la respuesta inmune.

En los tres integrantes del grupo de las *Bordetella* clásicas ha sido descrita la presencia de un cluster de genes que codifican para los constituyentes del TTSS altamente conservado [136]. El locus de secreción de tipo III de *Bordetella* ha sido denominado *bsc*, el cual está constituido por un total de 22 ORF. Entre estos se encuentran los que codificarían para las proteínas de la maquinaria del TTSS, la ATPasa BscN, proteínas secretadas TTSS y posibles chaperonas. Originalmente, la expresión funcional del TTSS pudo ser comprobada solamente para el caso de *B. bronchiseptica* aunque trabajos recientes evidencian la funcionalidad del mismo en *B. pertussis* [137-138]. *B. bronchiseptica* expresa las proteínas BopB y BopD, ortólogas de las proteínas translocadoras YopB y YopD de *Yersinia* spp. Estas proteínas interactúan entre sí para formar el poro en la membrana de células del huésped y son requeridas para la actividad citotóxica del TTSS [139-140]. Por su parte, la proteína BopC/BteA de *B. bronchiseptica* ha mostrado ser necesaria para las actividades citotóxicas de TTSS, que incluyen la muerte celular de sus células diana [141].

En base a las funciones descritas en bibliografía, podría describirse al TTSS de *B. bronchiseptica* como modulador de la maduración de células dendríticas e inductor de la actividad citotóxica y apoptótica en las células del hospedador [119, 142]. El efecto inmunomodulador del TTSS favorecería la persistencia bacteriana al suprimir las respuestas protectoras del hospedador [137, 143].

Regulación de expresión de los factores de virulencia.

En el género *Bordetella* la mayoría de los factores descritos anteriormente, a excepción de la citotoxina traqueal que es un producto de la síntesis del peptidoglicano y el LPS, se encuentran bajo el control de un locus denominado *Bordetella* *virulence* *gene* (*bvg*, antes designado *vir* por estar asociado con la regulación de la expresión de los factores de virulencia). Este locus *bvg*, que codifica para un sistema de dos componentes denominado BvgAS, fue identificado por Weiss y colaboradores en 1989 cuando observaron que la inserción del transposón Tn5 dentro del mismo, abolía simultáneamente la síntesis de PT, FHA, AC-Hly y TDN (denominados factores *bvg* activados) [144].

A través de ese sistema y en respuesta a determinadas señales del entorno (temperatura o presencia de Mg_2SO_4 o ácido nicotínico), las bacterias pueden cambiar el perfil de expresión proteica. El primer trabajo que reportó esta capacidad fue el realizado por Lacey en 1960. En su trabajo Lacey denominó modulación fenotípica al fenómeno de variación reversible de la expresión mediada por señales externas [145].

En dicho trabajo Lacey describió tres estados o variantes fenotípicas: dos variantes extremas a los que denominó X y C y una intermedia que designó I. Estas variantes se diferenciaban en la expresión de aglutinógenos y en la actividad hemolítica. Las células bacterianas en el estado fenotípico X, a diferencia de aquellas en el modo C, se caracterizan por ser capaces de aglutinar a los glóbulos rojos y presentar actividad hemolítica. El modo I, por su parte, presenta una expresión intermedia entre los fenotipos X y C. En lo que se refiere al rol funcional de estas variantes fenotípicas durante la infección para el caso de pertussis se observó que pacientes en estado convaleciente presentaban anticuerpos específicos contra la variante X mientras que los anticuerpos específicos de la variante C eran detectados en pacientes adultos cuya infección ya estaba alejada en el tiempo. Estas primeras descripciones fueron posteriormente extendidas a otras especies del género.

Luego de la descripción realizada por Lacey, se pudo identificar al locus *bvg* como el principal regulador de la expresión de uno y otro estadio, hoy conocidos como fase o variante virulenta y fase o variante avirulenta. En estudios posteriores se pudo detectar que las bacterias que contienen mutaciones en el locus *bvg* dejan de expresar los genes *bvg*-activados y resultan menos infectivas y menos virulentas. Por esta última razón, a las cepas bacterianas que tienen el locus *bvg* inactivado se las designa avirulentas y a las proteínas exclusivas de la fase, factores de avirulencia [146].

Las mutaciones espontáneas a nivel del locus *bvg* provocan una variación irreversible del fenotipo virulento a avirulento. A este tipo de variaciones irreversibles se la denomina **cambio de fase** [36, 146-147].

Cuando las proteínas BvgA y BvgS (codificadas por el locus *bvg*), están presentes en determinados niveles, los factores bacterianos asociados a la virulencia se expresan mientras que los factores característicos de fase avirulenta (denominados genes *vrg* por *v*irulence *r*epr*e*s*s*e*d* genes) se reprimen [36]. Este estadio fenotípico se denomina fase Bvg⁺ o fase virulenta mientras que al fenotipo propio de la inactivación del sistema BvgAS se denomina fase Bvg⁻ o fase avirulenta. Esta última se caracteriza por la ausencia de los productos codificados por los genes *vag* y por la expresión de los genes *vrg*.

La proteína BvgS es una proteína integral de la membrana citoplásmica que forma homodímeros. Su extremo N-terminal está dirigido hacia el periplasma. Contiene dos dominios receptores de señales del tipo Trampa de Moscas Venus (VTF) [149], separados de un tercer

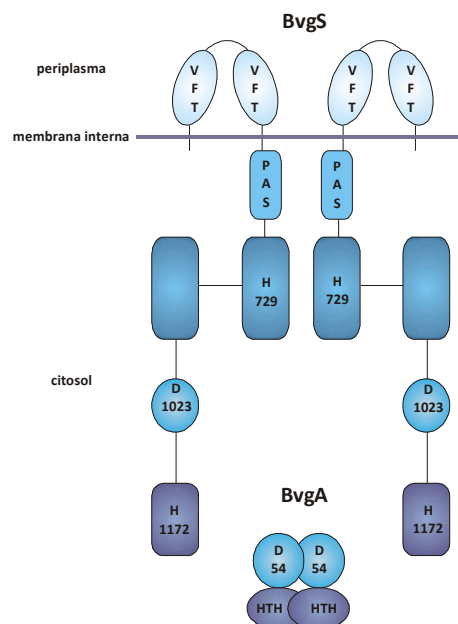


Figura 1.3 Esquema del sistema BvgAS.

Adaptado de [148], los nombres de la figura se encuentran señalados en el texto.

dominio receptor por un dominio transmembrana de tipo PAS. Este tercer dominio receptor tiene una localización citoplasmática [149]. La región consecutiva es la responsable de sensar y transmitir respectivamente la señal externa hacia la parte C-terminal presente en el citoplasma de la bacteria a través de una serie de fosforilaciones que se asocian luego a la activación del componente efector del sistema de dos componentes, BvgA [150] (ver Figura 1.3).

La porción de BvgS localizada en el espacio citoplasmático se encuentra dividida en tres dominios diferentes: transmisor, receptor y el extremo dador de fosfatos C-terminal. La traducción de la señal del entorno se inicia con una fosforilación de la histidina H729 presente en el dominio transmisor, la cual es dependiente de ATP y autocatalizada por BvgS. La transferencia del grupo fosfato hacia el dominio C-terminal es dependiente de la presencia del dominio receptor [151]. Este último dominio no sólo regula de manera positiva esta transferencia, si no que puede revertir la transferencia fosforilándose a sí mismo y retardando la activación de BvgA (Figura 1.4).

El dominio C-terminal de BvgS traduce la señal fosforilando a la otra proteína del sistema de dos componentes, la proteína BvgA.

Esta última es una proteína de 23 KDa que está presente en el citoplasma en forma de homodímeros. El residuo aspartato D54 de la proteína BvgA es el que resulta fosforilado por BvgS. La forma fosforilada de BvgA, BvgA~P, es la que posee mayor afinidad por los sitios de unión presentes en los promotores de los genes que codifican para los factores de virulencia regulados por este sistema [152-155]. Como sitio de unión de BvgA se ha descrito una secuencia TTTCCTA de siete bases y secuencias homólogas que se encuentran de manera directa o invertidas en los genes regulados por BvgA [156]. La unión de BvgA~P a estas secuencias induciría la oligomerización de BvgA [157]. El dímero de BvgA~P presenta una mayor afinidad por la secuencia consenso de siete bases [152]. Esta secuencia se encuentra en general alejada del inicio de transcripción, sin embargo una vez que se une un dímero de BvgA~P a la secuencia consenso se unen luego sucesivos dímeros hasta alcanzar el sitio de unión de la ARN polimerasa. La interacción de esta última enzima con la molécula

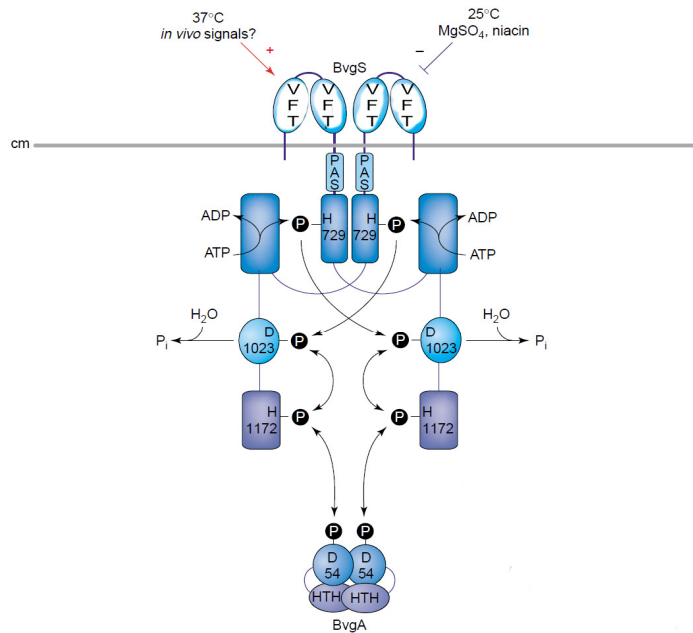


Figura 1.4 Esquema del mecanismo de activación del sistema BvgAS.

La cascada de fosforilaciones desencadenada por la activación del sistema de dos componentes BvgAS se encuentra representada en esta figura [150].

de BvgA~P adyacente al inicio de transcripción incrementa la eficiencia del inicio de la transcripción [158].

El funcionamiento de BvgAS de *Bordetella* spp. fue en un principio considerado como un sistema on/off o de encendido/apagado de los genes de virulencia [159-161]. Sin embargo, la descripción reciente de proteínas de expresión intermedia que no corresponden ni a los genes *vag* ni a los *vrg* [162], ha conducido a una reformulación de la hipótesis referente al mecanismo de regulación mediado por BvgAS. Este es actualmente considerado un sistema similar a un reóstato, capaz de regular la expresión de un amplio abanico de fenotipos ubicados entre los extremos correspondientes a las clásicas fases de virulencia y de avirulencia [108, 151, 163]. Estrategias moleculares como la transcriptómica y la inserción de genes reporteros han permitido describir cuatro [150] ó inclusive cinco [108, 151] grupos de genes dependiendo de los moduladores presentes y de la concentración de los mismos (Figura 1.5) [108, 149].

Los genes que se encuentran regulados por el sistema han sido agrupados en clases en función de la intensidad del efecto de los agentes moduladores sobre sus niveles de expresión.

Los primeros promotores reconocidos por la proteína BvgA fosforilada son los correspondientes a la clase 2 presentes por ejemplo en la adhesina FHA. Este promotor contiene un sitio de alta afinidad para BvgA. Si bien BvgA puede unirse a este sitio, sólo la forma fosforilada es capaz de activar el inicio de la transcripción [156]. El primer dímero de BvgA~P se une de manera específica a la secuencia consenso, mientras los dos siguientes, como en el caso del gen *phaB*, lo harían de manera cooperativa independientemente de la secuencia. Luego los dominios C-terminales de la subunidad α de la ARN polimerasa se unen a los dímeros de BvgA~P desde el otro lado de la cadena de doble hélice del ADN iniciándose así la transcripción del gen [158, 164-165].

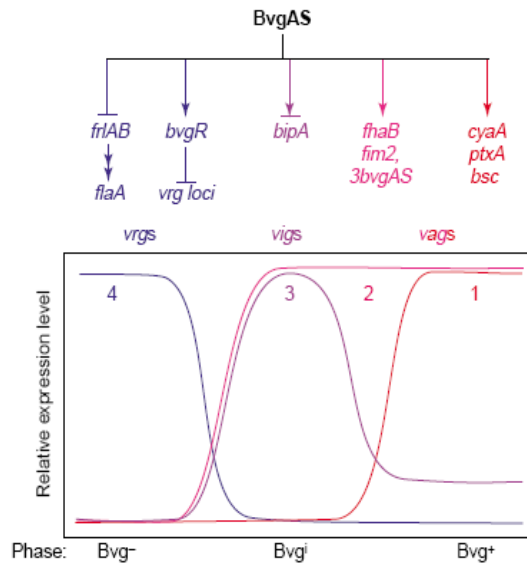


Figura 1.5 Variación de la actividad transcripcional de genes característicos de fase por efecto de los agentes moduladores.

En esta figura se describe esquemáticamente el efecto del sistema de dos componentes BvgAS sobre ejemplos representativos de cuatro grupos de genes. Estos han sido agrupados en función de la intensidad del efecto de los agentes moduladores sobre sus niveles de expresión. Se detalla la ubicación de los fenotipos extremos avirulento (Bvg⁻), virulento (Bvg⁺) e intermedio (Bvgⁱ) y sus respectivos grupos de genes asociados (*vrg*, *vag* y *vri*, respectivamente). Por último se han esquematizado los niveles relativos de expresión de genes de cada uno de las cuatro clases, con ejemplos de cada uno de ellos, en función de la transición entre fenotipos extremos. La imagen ha sido adaptada de Cotter y Jones [150].

Los genes de la clase 1 como *cyaA* y *ptxA*, no poseen sitios de unión para BvgA de alta afinidad y en su lugar se encuentran múltiples secuencias con leves diferencias respecto a las de alta afinidad espaciadas a lo largo de la secuencia *upstream* de cada uno de los genes [166-167]. BvgA debe estar fosforilado para unirse a estos sitios y la concentración de los dímeros es mucho mayor a la requerida para que se active *fhaB* y ello justifica la transcripción tardía en la escala temporal de la Figura 1.5 [154].

Los genes de clase 3 presentan un patrón de expresión algo más complejo. En el caso de un gen que codifica para una proteína característica de la fase intermedia BipA (*bipA*), se han descrito secuencias consenso de unión para BvgA de alta y baja afinidad [162]. El primero se encuentra *upstream* del gen y actuaría de igual manera que en el caso de *fhaB*. Sin embargo los sitios de baja afinidad se encuentran ubicados *downstream* del inicio del gen *bipA*. La unión de BvgA~P a estos sitios impediría la transcripción del gen, probablemente impidiendo de manera estérica la unión de la ARN polimerasa al sitio de inicio de la transcripción. A través de la detección de manera cuantitativa de los moduladores de BvgAS es posible regular la relación de concentraciones entre BvgA y BvgA~P. El delicado balance entre estas dos formas de BvgA permiten o no la expresión de los genes de la fase intermedia. Mientras que la concentración de BvgA~P es alta tanto los sitios de alta como de baja afinidad se encuentran ocupados por lo que estos genes no se expresarán. Al descender el nivel de la forma activa de BvgA los sitios de baja afinidad son liberados y el gen de fase intermedia es expresado. Finalmente, una vez que la cantidad de BvgA~P haya descendido notablemente los sitios de alta afinidad serán liberados y el gen deja de ser expresado.

La información disponible acerca de los mecanismos de regulación de la transcripción de los genes clase 4, correspondientes a proteínas propias de la fase avirulenta (genes *vrg*) es aún escasa. Se ha descrito un mecanismo de inactivación por unión directa de BvgA a la secuencia promotora de genes *vrg* [168]. Otro mecanismo alternativo propuesto de represión de estos genes ocurre de manera indirecta a través de la participación de una proteína reguladora denominada BvgR. El gen que codifica para este regulador (gen *bvgR*) se encuentra río abajo del locus *bvgAS* [169-170]. Este gen ha sido descrito en *B. pertussis* [169] y *B. bronchiseptica* [91] y su producto de transcripción BvgR contiene motivos de reconocimiento de secuencias consenso pre-

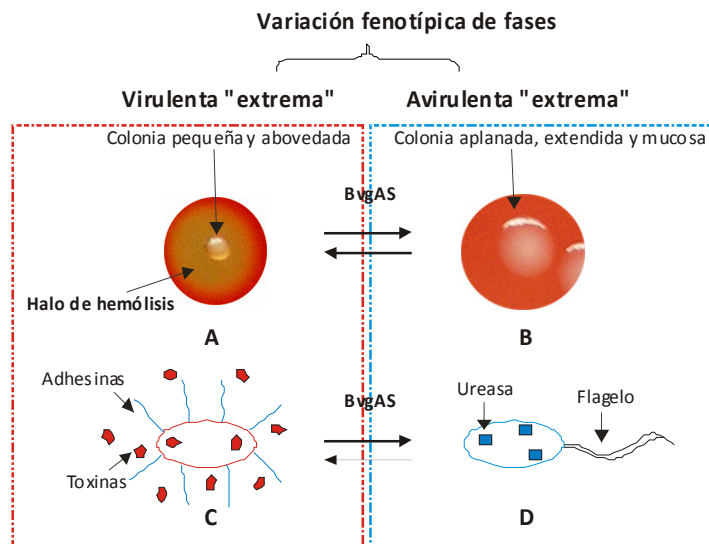


Figura 1.6 Esquema de las fases fenotípicas extremas de *B. bronchiseptica*.

Se presentan en la figura los cambios en las características morfológicas de las colonias de *B. bronchiseptica* en fase virulenta (panel A) y en avirulenta (panel B). Se muestran los marcadores de fase característicos (paneles C y D).

sentos en los promotores de los genes *vrg* [171]. A su vez este gen es regulado negativamente por BvgA [170]. Es decir que su regulación es diferente al observado en el resto de genes *vag* [172]. Mientras que para los genes *vag*, la unión de BvgA~P ocurre de manera secuencial desde un punto apartado del sitio de unión de la ARN polimerasa hacia dicho sitio, en el caso del gen *bvgR*, la unión ocurre primero cerca de este sitio y luego en los más alejados.

La fase avirulenta en *B. bronchiseptica* se caracteriza no solamente por presentar una morfología característica en sus colonias (Figura 1.6), sino por la ausencia de expresión de los factores conocidos como factores de virulencia y la expresión de los factores de avirulencia. En los factores y enzimas característicos de la fase avirulenta se pueden mencionar a:

Flagelo: El flagelo de *B. bronchiseptica*, por analogía estructural con los de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, puede describirse como conformado por tres componentes principales: el cuerpo basal, el codo o gancho y el filamento [173]. El filamento y el codo son extracelulares y el cuerpo basal se encuentra inmerso en la membrana celular. El cuerpo basal es una estructura compleja formada por un cilindro y dos pares de anillos: uno exterior y otro interior. Los dos anillos exteriores se denominan L y P. El anillo L debe su nombre a que se encuentra en la membrana externa (compuesta principalmente por lipopolisacárido) y está constituido por la proteína FlgH. El anillo P se halla inmerso en el espacio transmembrana (estructura que contiene peptidoglicano) y está formado por la proteína FlgI. Los dos anillos interiores se denominan S y M. El anillo S está en el espacio periplásmico, inmediatamente por encima de la membrana plasmática y el M está inmerso en dicha membrana, de hecho ambos anillos son dominios de una misma proteína (FliF) y por ello se lo denomina actualmente anillo MS. El cilindro del cuerpo basal está formado por cinco proteínas (FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgJ) y atraviesa el interior de este conjunto de anillos, conectándolos entre sí. La proteína FlgJ ha sido propuesta como “tapa” del cilindro y también posee una actividad muramidasa que disolvería la membrana de peptidoglicano, permitiendo de esta forma el ensamblaje del cilindro y su pasaje hacia el espacio periplásmico. De esta manera el cilindro queda unido por su porción terminal al anillo MS y por su extremo distal con el codo del flagelo.

El cuerpo basal es considerado una estructura pasiva del flagelo que actúa de soporte de las proteínas implicadas en el mecanismo de rotación. El flagelo puede rotar gracias a la presencia de un motor reversible que obtiene su energía a través de fuerza protomotriz. Este motor está formado por las proteínas FliG, FliM y FliN y se encuentra por debajo del anillo MS.

El codo es una estructura corta, curvada y hueca que conecta el cuerpo basal con el filamento. Está formado por subunidades de la proteína FlgE, que se disponen en forma de hélice generando un canal interior circunscripto por 11 subunidades. De esta forma existen 11 fibrillas dispuestas en forma casi perpendicular al eje del codo, de manera que se genera macroscópicamente una forma de hélice en toda la estructura. Distintos cambios fisiológicos, como pH o fuerza iónica, permiten que se formen una variedad de hélices diferentes en las que se modifica la distancia entre las distintas subunidades, dando lugar a estructuras polimórficas. La forma curvada característica del codo se debe a que su corta longitud determina que se forme menos de media vuelta de hélice.

En el extremo distal del codo se encuentran las proteínas FlgK y FlgL que regulan la longitud de esta estructura y conectan el codo con el filamento flagelar. El filamento está conectado a la célula a través del codo, y está estructuralmente relacionado con el mismo, pero está formado por subunidades de otra proteína, la flagelina. La secuencia de la flagelina puede dividirse en tres regiones: los dominios N- y C- terminales y la región central. Los dominios N- y C- terminales son los responsables de la interacción entre las distintas subunidades de flagelina y de su polimerización. El dominio central es el más inmunogénico. Finalmente, en el extremo distal del filamento se encuentra la proteína FliD, que actúa como “tapa” del mismo.

Como mencionamos anteriormente, la síntesis de flagelo en *B. bronchiseptica* se encuentra regulada negativamente por el sistema de dos componentes BvgAS [174]. Específicamente, el sistema regula la expresión del operón maestro *frlAB* que codifica para un activador de la transcripción de otros genes flagelares. La función del flagelo y la flagelina han sido estudiadas sobre todo con el objetivo de avanzar en el conocimiento de la fase avirulenta en el ciclo de *B. bronchiseptica*. Así se ha reportado que la flagelina de *B. bronchiseptica* juega un rol como adhesina [89-90, 92, 175-176].

Ureasa (Ure): La ureasa es una enzima que cataliza la degradación de la urea a amonio y dióxido de carbono. En muchas bacterias el amonio liberado por esta reacción es utilizado como fuente de nitrógeno, mientras que en otras actúa como factor de virulencia debido a la capacidad de aumentar la concentración de amonio hasta niveles tóxicos y cambio del pH que ocurre durante la catálisis [177-179]. La mayoría de las enzimas descritas hasta el momento, con la excepción del género *Helicobacter*, se encuentran formadas por tres subunidades, UreA, UreB y UreC dispuestas con la conformación (UreABC)₃ [179]. Además de los genes estructurales *ureA*, *ureB* y *ureC*, se requiere de la expresión de varios genes accesorios para la expresión de la enzima en su forma activa. Estos genes se encuentran ubicados en posiciones adyacentes a los genes estructurales y participarían en la asimilación del cofactor níquel y en la activación de la enzima. En *B. bronchiseptica* en este mismo cluster pero orientado en dirección opuesta se encuentra un gen que codifica para un activador transcripcional, BbuR. Si bien mutantes defectivos en BbuR no presentan actividad ureasa, se desconoce de qué forma participa este activador transcripcional en la expresión de la enzima. La expresión de esta enzima además es regulada negativamente por el sistema de dos componentes BvgAS [180].

En cuanto al rol de la actividad ureasa se ha sugerido que la misma jugaría un papel importante en la supervivencia intracelular de *B. bronchiseptica*. En particular se ha observado que la adición de urea al medio incrementa la sobrevivencia intracelular bacteriana luego de 24 horas en cepas salvajes pero no en mutantes defectivos en la expresión de esta enzima [180]. A pesar de los resultados anteriores, ensayos de colonización en cobayos y en ratones no presentaron diferencias para cepas con y sin actividad ureasa [181-182]. Si bien estos resultados indicarían que la enzima ureasa no es necesaria en las primeras etapas de la infección, queda aún por analizar el rol de la misma en los estadios de cronicidad aún no estudiados.

Lipopolisacárido (LPS): El sistema BvgAS regula la expresión de enzimas involucradas en la síntesis del LPS. En particular se ha observado que la expresión de la enzima PagP que cataliza la unión de un residuo de ácido palmítico sobre el lípido A del LPS es inhibida durante la expresión del fenotipo avirulento. Las modificaciones en la estructura del LPS mediadas por esta enzima alteran la persistencia de las bacterias en

el pulmón, siendo esta mínima cuando la enzima deja de expresarse [131, 183]. El antígeno O también se ha mostrado susceptible a la actividad del sistema BvgAS [184].

Citocromo bd: Durante la transición de fase virulenta a avirulenta se produce una disminución en la expresión del citocromo bd conjuntamente a un incremento en la expresión del citocromo bo [185]. De acuerdo a lo observado en otras especies bacterianas, la expresión de estos citocromos suele ser máxima en condiciones de menor y mayor aireación de los cultivos, respectivamente [186].

Otros mecanismos de regulación sensibles a señales externas

El sistema BvgAS no es el único sistema de dos componentes descrito en *Bordetella spp.* En el genoma de *B. bronchiseptica* RB50 se han identificado al menos 15 secuencias que codificarían para otros sistemas de dos componentes. Más aún, previamente a la secuenciación genómica de esta cepa ya se había identificado otro sistema de dos componentes al que se lo denominó Ris del inglés *regulator of intracellular response*. Al igual que BvgAS, el sistema Ris se encuentra compuesto por un regulador (RisA) y un sensor (RisB) [95]. En *B. bronchiseptica* y en *B. pertussis*, los genes que codifican para estas proteínas se encuentran separados entre sí por una única base.

El sistema Ris es funcional a 37°C y en presencia de bajas concentraciones de iones Mg^{+2} [95]. La actividad del sistema está asociada a un aumento en la resistencia de la bacteria al estrés oxidativo y a una inducción de la expresión de una fosfatasa ácida [95-96]. La única proteína descrita hasta el momento que es regulada positivamente por Ris es justamente la fosfatasa ácida antes mencionada [95]. Se ha sugerido que la expresión de esta enzima se induce durante la vida intracelular y estaría probablemente vinculada a la defensa frente a la acción oxidativa del contenido lisosomal. No obstante es necesario aún profundizar en el estudio de este sistema para comprender su rol en el ciclo de vida de la bacteria.

Por otro lado, en *B. bronchiseptica* se ha detectado que variaciones en la temperatura inducen cambios fenotípicos independientes de los sistemas BvgAS y del RisAS. Estos cambios afectan la adhesión y sobrevivencia intracelular bacteriana en células macrófagas [93] y en la colonización inicial del tracto respiratorio [38]. La caracterización molecular de los cambios Bvg-independientes inducidos por el descenso de la temperatura es aún relativamente escasa. Algunos de los cambios observados involucran al LPS [184] y la expresión molecular de varias proteínas [187].

Se han observado también cambios en el perfil de expresión de *B. bronchiseptica* dependientes de la concentración externa de hierro. La concentración de este metal varía a lo largo del ciclo biológico de *B. bronchiseptica*, tanto durante su estadio en el medio ambiente como en los diferentes compartimentos del huésped. *B. bronchiseptica* es capaz de responder y adaptarse a concentraciones cambiantes de hierro, mediante un complejo mecanismo regulatorio [188-189]. Esta capacidad de respuesta, Bvg-independiente [190-191], desempeña un importante papel durante el proceso infeccioso [188-189].

Rol de los cambios de expresión fenotípica en la transmisibilidad y sobrevivencia de *B. bronchiseptica*

En la transmisibilidad

En las zoonosis en general, el mecanismo de transmisión de microorganismos al huésped puede ocurrir de manera **directa** o **indirecta** [6, 11]. La transmisión directa involucra un contacto estrecho del hombre con el animal, mediante rasguños, mordeduras, proyecciones respiratorias (tos o estornudos) u otro tipo de descarga productiva infectada. La transmisión indirecta puede involucrar vectores biológicos de transmisión, como por ejemplo insectos artrópodos (mosquitos, pulgas, garrapatas, etc), o, alternativamente, el contacto con objetos inanimados conteniendo al patógeno. Estos últimos son denominados fomititas, siendo ejemplos de ellos objetos punzantes, partículas de polvo en suspensión en el aire, etc.

Para el caso particular de los patógenos respiratorios, como es el caso de *B. bronchiseptica*, la vía de transmisión más importante es la mediada por las proyecciones respiratorias [6, 192]. Así, en un episodio de tos por ejemplo se pueden generar entre 5000-6000 gotas de menos de 100 μm de diámetro, mientras que en un estornudo, el número de gotas puede ser incluso cercano al millón. Los microorganismos contenidos en esas gotas pueden permanecer en suspensión en el aire durante varias horas [192]. En condiciones de confinamiento o contacto estrecho animal-animal o animal-humano el riesgo de una transmisión infectiva a través de estas gotas es muy alto. *B. bronchiseptica* se destaca del resto de las especies del grupo de las Bordetella clásicas por poseer una alta capacidad infectiva, pudiendo un inóculo de tan sólo 10 bacterias en 5 μl lograr una infección efectiva en animales [35].

Los estadios de cronicidad de las infecciones causadas por *B. bronchiseptica* y la capacidad de este patógeno de sobrevivir fuera de huésped representan sin dudas un riesgo latente en la transmisibilidad de la infección [15, 17].

Se ha reportado que *B. bronchiseptica* es capaz de sobrevivir por al menos cinco días en gotas secas dispuestas sobre vidrio, tres días sobre tela, alrededor de seis semanas en el suelo y al menos tres semanas en solución salina isotónica (PBS) [36, 193]. Hasta el momento este microorganismo no es considerado un microorganismo medioambiental, sin embargo su resistencia a condiciones ambientales restrictivas o adversas no permite descartar un posible rol en la transmisión por vía de fomititas. Este mecanismo de transmisión es favorecido en condiciones de escasa higiene.

Respecto del rol de las fases virulenta-avirulenta en el ciclo de vida de *B. bronchiseptica*, la hipótesis más aceptada en la actualidad refiere que la primera resulta esencial en el establecimiento y progreso de la infección mientras que la segunda jugaría un rol importante frente a las condiciones de estrés tanto fuera como dentro del huésped [35-36, 160, 194].

Dentro del huésped este patógeno se encuentra con diferentes condiciones ambientales que pueden modular la actividad del sistema BvgAS. Un ejemplo claro de ello es el gradiente de temperatura existente a medida que la bacteria desciende en el tracto respiratorio del huésped desde la cavidad nasal. Las bacterias localizadas en esta última región podrían poseer un perfil de expresión al menos intermedio entre los fenotipos extremos virulento y avirulento [39, 195]. En ensayos de infección en ratas se ha observado que cepas moduladas a fase avirulenta por la temperatura son más eficientes en la colonización temprana que las cepas en fase virulenta [38]. Estas

diferencias en etapas más tardías no se observarían e incluso en los estadios de infección posterior resulta clave la expresión de los factores de avirulencia [35-36].

La falta de un modelo de transmisión imposibilita la profundización de estudios focalizados a comprender el rol en la transmisión de sistemas como el BvgAS quedando por ahora más hipótesis que certezas.

En la sobrevida y persistencia.

El modelo de infección de *B. bronchiseptica* en ratón permitió establecer que la presencia del patógeno en el pulmón lleva al arribo masivo de leucocitos polimorfonucleares [35, 88, 196]. Sin embargo, esta bacteria es capaz de superar esta respuesta del huésped pudiendo sobrevivir por períodos de tiempo aún más prolongados que los descritos para *B. pertussis* [35]. El mecanismo molecular que permite a *B. bronchiseptica* sobrevivir y persistir en un contexto inflamatorio aún no ha sido esclarecido. Probablemente la vida intracelular detectada en células como las epiteliales [89-91], dendríticas [95, 197] e inclusive células macrofágicas [92-97] sea uno de los mecanismos que *B. bronchiseptica* utilice para evadir la respuesta inmune del huésped y persistir dentro de él. De hecho se ha observado que la capacidad de sobrevida intracelular en células macrofágicas de *B. bronchiseptica* incluso en fase avirulenta es superior a la de *B. pertussis* [89, 92, 95, 97].

Durante el estadio intracelular, *B. bronchiseptica* no interferiría con la maduración y fusión de las vacuolas que contienen la bacteria con los lisosomas [92, 97, 197]. Se ha demostrado que la fagocitosis de *B. bronchiseptica* por parte de células macrofágicas, conduce a una maduración y acidificación de las vacuolas que la contienen hasta un pH final cercano a pH: 5,1 [97]. El efecto de la acidez de las vacuolas sobre la supervivencia intracelular del patógeno es escasa y contradictoria [96-97]. La invasión experimental de células de línea macrofágica MH-S por *B. bronchiseptica* muestra que la inhibición de la acidificación de vacuolas produce un impacto negativo en la sobrevida intracelular de esta bacteria [97]. Estos resultados concuerdan con los reportados para otros patógenos como *Brucella suis* [198] y *S. typhimurium* [199-200].

Nos detendremos aquí para incluir algunas descripciones de la condición de acidez ya que la misma fue objeto de estudio durante mi trabajo de tesis. Específicamente, la acidificación del entorno durante la infección no pareciera ser una característica exclusiva del estadio intracelular del patógeno. El líquido extracelular que recubre el epitelio del aparato respiratorio designado ASL por su acrónimo inglés *airway surface liquid*, varía su pH cuando el mismo se enfrenta a un patógeno [201]. Así, las infecciones de etiología bacteriana que llevan a procesos inflamatorios incrementan la acidez del medio [201-203] como consecuencia de la secreción de ácidos metabólicos generados tanto por leucocitos reclutados desde la periferia [202]. Este entorno ácido tiene un efecto negativo sobre varios de los efectores de la respuesta inmune favoreciendo así la continuidad del proceso infeccioso [202, 204].

En el caso de *B. bronchiseptica*, el pH óptimo de crecimiento se encuentra en torno a la neutralidad por lo que se considera un organismo neutralófilo. Para estas bacterias se han descritos tres mecanismos diferentes de respuesta frente a condiciones de estrés ácido: **Adaptación**, **Resistencia** y **Aclimatación**. El primero de ellos, involucra un cambio adaptativo del microorganismo como consecuencia de su incubación previa en medios de acidez moderada. La **adaptación** permite a la bacteria

resistir a condiciones extremas de acidez que de otra forma resultarían letales [205]. Este tipo de respuesta involucra cambios en la expresión proteica (18 proteínas por ejemplo para el caso de *S. typhimurium*), que le permiten a la bacteria mantener la homeostasis de pH intracelular. Este mecanismo es habitualmente descrito en la literatura como *respuesta adaptativa de tolerancia a la Acidez* ó ATR. La respuesta ATR, identificada veinte años atrás en *E. coli* y *S. typhimurium*, puede considerarse actualmente como un mecanismo ampliamente difundido tanto microorganismos Gram negativos como en Gram positivos [206-208].

El segundo mecanismo, el de **resistencia** a la acidez, corresponde a la respuesta que se desarrolla cuando la bacteria se enfrenta durante breves períodos de tiempo a condiciones severas de acidez y luego a condiciones extremas de acidez [209]. Esta respuesta involucra también cambios en la expresión proteica. Este mecanismo le permite sobrevivir a la bacteria a esa condición extrema pero no puede multiplicarse.

Finalmente, otro mecanismo es la **aclimatación**, que permite a la bacteria no sólo sobrevivir sino además multiplicarse en condiciones drásticas de acidez [210]. El caso mejor estudiado es *H. pylori*, bacteria neutralófila capaz de multiplicarse y mantenerse de manera estable durante años en el estómago del hombre, compartimiento cuyo pH puede llegar a ser incluso cercano a pH: 1,0.

Dado que *B. bronchiseptica* debe exponerse *in vivo*, a entornos ácidos tanto durante su tránsito intracelular como extracelular, en la superficie de las mucosas, resulta interesante analizar su comportamiento frente a esta condición de estrés medioambiental. Este comportamiento en *B. bronchiseptica* ha recibido escasa atención en la literatura. La presencia del mecanismo denominado respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez (ATR), descrita con mucho detalle en bacterias como *S. typhimurium*, no fue detectado en *B. bronchiseptica*, al menos en las condiciones experimentales ensayadas [97]. Estos resultados, sin embargo no pueden ser considerados concluyentes, dado que la magnitud y observación de este tipo de respuestas depende de factores experimentales como lo son: la fase de crecimiento del cultivo al momento del desafío letal [206, 211], la duración de la adaptación al pH intermedio [209], el valor de pH intermedio empleado [207], la naturaleza del ácido empleado [212-213], la composición del medio de cultivo [214], entre otros. Más aún, dentro de una misma especie bacteriana, las características de la ATR pueden variar entre distintas cepas [215]. Por esta razón, consideramos que la presencia de ATR en *B. bronchiseptica*, en función de la escasa bibliografía disponible, no puede ser aún totalmente descartada y su estudio merece ser profundizado.

En este contexto, mi trabajo de tesis se focalizó en el estudio del comportamiento de *B. bronchiseptica* frente a la acidez de forma de contribuir al conocimiento del ciclo biológico de este patógeno capaz de inducir zoonosis.

Capítulo 2

Resistencia a la acidez y respuesta ATR en *B. bronchiseptica*.

Resistencia a la acidez y respuesta ATR en *Bordetella bronchiseptica*.

Introducción

Para sobrevivir en un nicho particular, las bacterias no sólo requieren monitorear continuamente las condiciones del medio externo sino además poseer la capacidad de utilizar esa información para desarrollar una respuesta adaptativa. En el caso de *B. bronchiseptica* estas actividades son esenciales y evidentes ya que durante su ciclo de vida se enfrenta a diferentes entornos tanto dentro como fuera del huésped. Como hemos mencionado en la introducción general de este trabajo, una de las condiciones que enfrenta *B. bronchiseptica* es la acidez. No obstante su potencial relevancia, el conocimiento del efecto de la acidificación del medio sobre la sobrevivencia de *B. bronchiseptica* es escaso. Schneider y colaboradores reportaron que *B. bronchiseptica* presenta una mayor resistencia a la acidez que *B. pertussis* [97]. Sin embargo estos autores no pudieron detectar la capacidad de desarrollar una respuesta de tipo ATR (respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez). Esta respuesta fue inicialmente descrita en *S. typhimurium* [206] y posteriormente demostrada en otros patógenos [207, 216]. Esta respuesta incrementa la sobrevivencia de las bacterias cuando estas se enfrentan a una condición de acidez letal [206].

Teniendo en cuenta que la detección de la respuesta de tipo ATR es dependiente de las condiciones experimentales ensayadas nos propusimos re evaluar esta posibilidad en *B. bronchiseptica*. Para ello primeramente definimos las condiciones experimentales y determinamos los valores de pH de crecimiento límite, de adaptación (acidez intermedia) y de muerte (acidez extrema). Evaluamos también diferencias en el posible comportamiento de resistencia/adaptación entre los fenotipos virulento y avirulento de *B. bronchiseptica*.

Los resultados alcanzados se detallan a continuación.

Resultados

Efectos de la acidez en la cinética de crecimiento en *B. bronchiseptica*.

La primera etapa de nuestro estudio sobre el efecto de la acidez consistió en analizar el comportamiento cinético de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 (CIP, Colección de cepas del Instituto Pasteur de París, Francia), frente a diferentes condiciones de acidez. Para ello se empleó el medio sintético Stainer Scholte (SS) recomendado para el cultivo de *Bordetella* [217]. En este medio, el metabolismo de *B. bronchiseptica* provoca un aumento del pH del medio desde un valor de pH: 7,20 hacia a la alcalinidad, pH: 8,70 – 9,10. Con el objetivo de trabajar en un sistema batch manteniendo el pH prácticamente constante hasta el final del cultivo, realizamos modificaciones en la composición del medio SS original. En particular cambiamos el tipo y/o la concentración del buffer empleado. Los cambios realizados se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Modificaciones sobre la composición original del medio de cultivo Stainer Scholte.

Medio de cultivo	Sustancia buffer	Concentración (mM)	pH inicio cultivo
SS original	Tris (pKa=8,06, 25°C)	12,5	7,2
SS modificación 1	Tris (pKa=8,06, 25°C)	20,0	6,0-7,2
SS modificación 2	MES (pKa=6,10, 25°C)	20,0	3,9-5,5

Luego con el objetivo de minimizar la duración de la fase lag del crecimiento bacteriano se partió de un inóculo con una concentración bacteriana de 7×10^8 bacterias/ml (equivalente a una DO_{50nm} de 0,300). Las cinéticas de crecimiento bacteriano obtenidas para los distintos pH se muestran en la Figura 2.1.

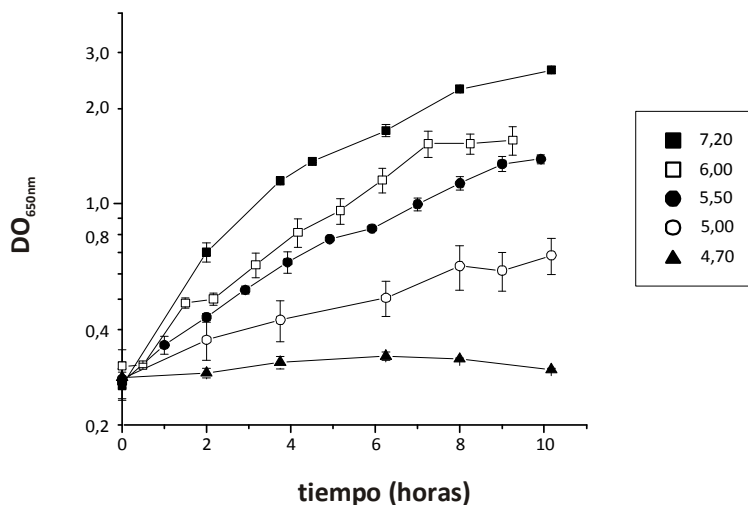


Figura 2.1 Cinética de crecimiento de *B. bronchiseptica* en fase virulenta en distintas condiciones de acidez.

Los medios de cultivo empleados fueron formulados a partir del medio sintético de Stainer Scholte (SS) con diferentes buffers para alcanzar los siguientes pH iniciales (pHi): pH: 7,20 (■), pH: 6,00 (□), pH: 5,50 (●), pH: 5,00 (○) y pH: 4,70 (▲). En todos los casos se empleó como inóculo una suspensión bacteriana proveniente del medio SS sin modificar (pHi: 7,20), en fase exponencial tardía. Los datos presentados se corresponden al promedio de resultados obtenidos en al menos tres ensayos independientes. Se incluyen las desviaciones estándar.

Como puede observarse en la Figura 2.1 durante el desarrollo bacteriano de *B. bronchiseptica* en los medios que permiten un valor de pH inicial (pHi) de 6,00 y de 5,50, los valores máximos de densidad óptica alcanzados fueron de aproximadamente DO_{650nm} : 1,80 (60% del valor obtenido a pH: 7,20) y DO_{650nm} : 1,56 (52% del valor obtenido a pH: 7,20), respectivamente. Estos valores fueron sensiblemente superiores a los observados para los otros valores de pHi analizados pero inferiores a los obtenidos en el medio SS original (pH 7,20). Concretamente, cuando el pH inicial fue de 5,00, el máximo valor de densidad óptica registrado fue de DO_{650nm} : 0,60, mientras que a pH: 4,70 directamente no se observó desarrollo bacteriano. En todos los casos, los pH alcanzados al final de los cultivos difirieron en menos de una unidad respecto de los valores iniciales (datos no mostrados).

Los valores de velocidad específica de duplicación para los cultivos con pHi 7,20 y 5,50, estimados a partir de variación en los valores de DO_{650nm} en el tiempo, fueron de $\mu_{aprox7,2}=0,370$ y $\mu_{aprox5,50}=0,208$, respectivamente. Estos valores muestran que a pHi: 5,50 la velocidad de crecimiento se reduce aproximadamente en un 56% comparada con el valor obtenido a pH: 7,20.

Los resultados hasta aquí presentados fueron obtenidos en al menos tres ensayos independientes. Experimentos realizados empleando valores de DO_{650nm} de partida iguales o menores a 0,1 arrojaron resultados similares a los incluidos en la Figura 2.1 (datos no mostrados).

Todos estos resultados muestran que el valor de pH que limita (pH límite) el crecimiento de *B. bronchiseptica* estaría próximo a pH: 5,00. Valores inferiores en solamente 0,30 unidades de pH (pHi: 4,70) no permiten observar un incremento en la densidad óptica con el tiempo. La evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de cultivo mostraron las mismas tendencias que las observadas con las medidas de DO_{650nm} e indicaron que en el medio SS a pH: 4,70, *B. bronchiseptica* no es capaz de duplicarse (datos no mostrados).

Estimación del pH en el cual observar muerte bacteriana

La siguiente etapa de nuestro estudio comprendió el establecimiento de un valor de pH en el cual se observa la muerte bacteriana (pH de muerte). La determinación de este valor resulta necesaria para luego poder evaluar la existencia de respuesta de tolerancia a la acidez (ATR) en *B. bronchiseptica*, uno de los objetivos centrales de nuestro trabajo. Para ello y en base a los resultados anteriores se escogieron como pH de muerte aquellos comprendidos entre pH: 4,20 y pH: 3,80, específicamente pH: 4,20, pH: 4,10, pH: 4,00 y pH: 3,80. Los ensayos consistieron en inocular estos medios con una suspensión bacteriana de *B. bronchiseptica* proveniente de un cultivo a pH: 7,20 y evaluar la recuperación de bacterias viables a partir de estos cultivos a diferentes tiempos durante un lapso de 6 h de exposición. Específicamente se empleó como inóculo una suspensión bacteriana proveniente de dos pasajes consecutivos en el medio SS pHi: 7,20 partiendo de una DO_{650nm} inicial de 0,20 y alcanzando una DO_{650nm} final cercana a 1,00. Las incubaciones se realizaron durante 6 h a 37°C y en intervalos de tiempo de 1 a 2 h se tomaron muestras con el fin de evaluar el porcentaje de bacterias capaces de sobrevivir en esas condiciones de acidez. En la Figura 2.2 se encuentran representados los resultados obtenidos experimentalmente.

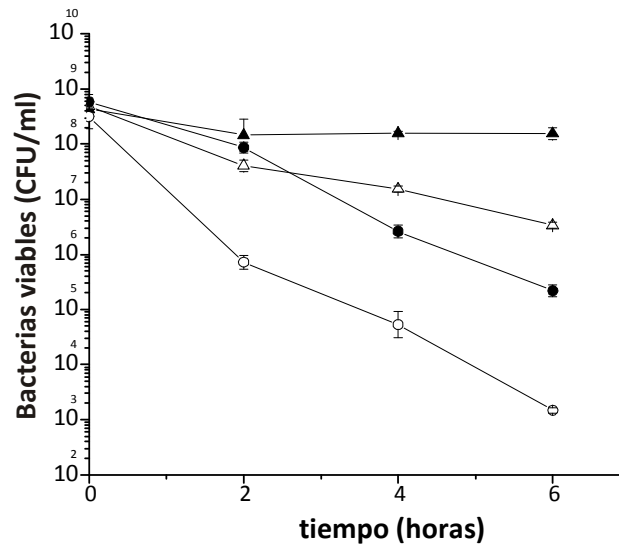


Figura 2.2 Cinética de muerte de *B. bronchiseptica* en acidez extrema.

Los valores de pH ensayados fueron de 4,20 (▲), 4,10 (△), 4,00 (●) y 3,80 (○). Los datos incluidos en esta gráfica representan uno de tres ensayos independientes con similares resultados. Se incluye en la representación el desvío estándar.

Como puede observarse en la Figura 2.2, valores de pH inferiores a pH: 4,20 producen descensos significativos en la proporción de bacterias recuperadas respecto al inóculo original. Más aún, los descensos del pH en tan solo 0,10 unidades tienen un profundo impacto sobre la viabilidad de *B. bronchiseptica*. Al cabo de seis horas de exposición al pH de muerte, la caída en los recuentos de bacterias viables registrada fue de aproximadamente 0,5; 2; 3 y 5 órdenes de magnitud para los cultivos en pH de pH: 4,20; pH:4,10; pH: 4,00 y pH: 3,80, respectivamente.

En base a los resultados obtenidos, seleccionamos como pH de muerte, para la evaluación de la respuesta ATR, el valor de pH: 4,00. Este valor de pH produce un descenso en la viabilidad de las bacterias lo suficientemente pronunciado como para permitir luego la observación de posibles atenuaciones en dicha caída sin que nos imposibilite visualizar el posible beneficio conferido por una respuesta del tipo ATR

Es interesante señalar que los valores de pH que han mostrado ser letales en el laboratorio son inferiores en aproximadamente una unidad a los observados y reportados en fagolisosomas conteniendo al patógeno [97]. Estos resultados permitirían establecer que la acción del pH en estos compartimentos no tendría consecuencias letales sobre la viabilidad bacteriana. En línea con esta observación, varios grupos han demostrado que el patógeno es capaz de mantenerse viable durante varios días dentro de células fagocíticas especializadas, sin alterar la maduración de sus vacuolas [92, 97, 197].

Búsqueda de la respuesta a la tolerancia a la acidez en *B. bronchiseptica*: Rol del estado de virulencia de la bacteria

La siguiente etapa de nuestro trabajo comprendió la evaluación de la capacidad de *B. bronchiseptica* de desarrollar una respuesta ATR [206-207, 218-219]. Para ello realizamos 2 cultivos sucesivos de *B. bronchiseptica* a: pH 7,20 y en paralelo otros dos

a pH 5,50, durante al menos dos tiempos de generación. Transcurrido ese tiempo de incubación, las bacterias recuperadas de cada condición fueron sometidas al pH de muerte (pH: 4,00). Denominamos condición de **no adaptación** o **control**, al cultivo bacteriano desarrollado a pH 7,20 y como condición de **adaptación** al crecimiento a pH 5,50 (Figura 2.3).

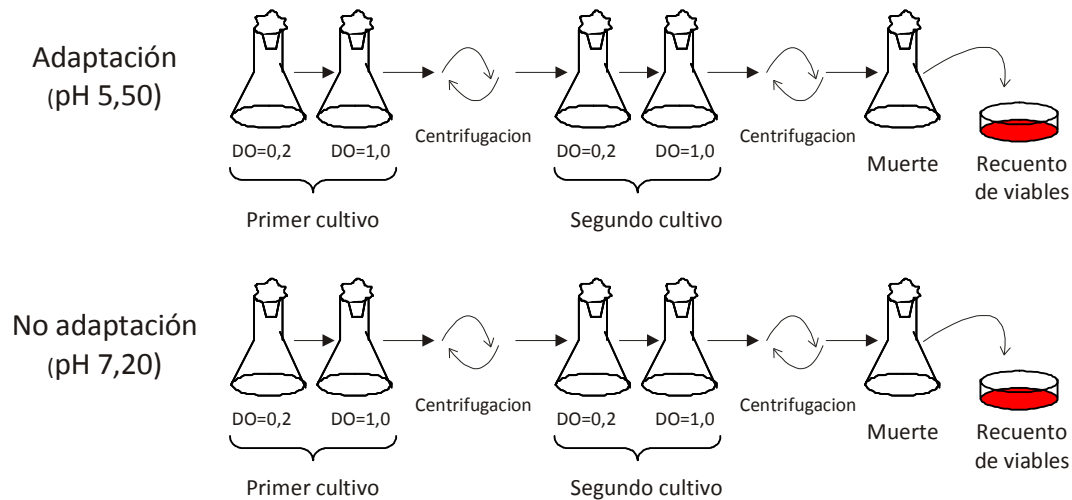


Figura 2.3 Esquema de la metodología empleada para el análisis de ATR en *B. bronchiseptica*.

El inóculo bacteriano inicial para ambas condiciones de pH estaba constituido mayoritariamente por bacterias en fase virulenta. Los cultivos a pH: 7,20 y pH: 5,50 se iniciaron con una DO_{650nm} de aproximadamente 0,20 y se finalizaron al alcanzar una DO_{650nm} cercana a 1,00. Al alcanzar estos valores de DO_{650nm} , se cosecharon las bacterias por centrifugación para ser empleadas de inóculo de los siguientes cultivos. Transcurrido este tiempo de duplicación de al menos dos generaciones se procedió nuevamente a la cosecha por centrifugación y las bacterias así obtenidas de las dos condiciones ensayadas, fueron sometidas al pH de muerte. La cinética de muerte fue evaluada en cada caso mediante el recuento de unidades formadoras de colonias en placas conteniendo el medio BGA suplementado con sangre desfibrinada. Los recuentos se realizaron a las 0, 2, 4 y 6 h post inoculación.

A cada tiempo se evaluó además el estado de virulencia de las bacterias sobrevivientes a la condición de estrés. Los resultados se muestran en la Figura 2.4.

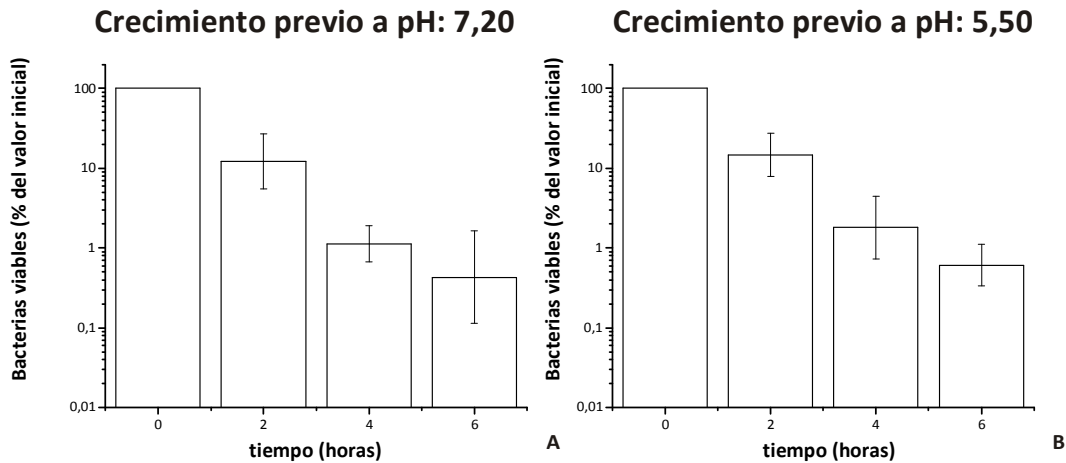


Figura 2.4 Análisis de la presencia de la respuesta de tolerancia a la acidez en *B. bronchiseptica*.

En el panel A se representan los resultados obtenidos para las bacterias cultivadas en la condición de no adaptación y en el Panel B los obtenidos para los cultivos de la condición denominada de adaptación. Se consigna el recuento proporcional de bacterias viables totales respecto al valor inicial. Los valores representados corresponden a los valores medios de tres ensayos independientes. Se incluyeron desviaciones estándares de los datos experimentales obtenidos.

Las diferencias observadas en la Figura 2.4 entre los cultivos a pH: 5,50 y pH: 7,20 no resultan ser estadísticamente significativas. Sin embargo, un aspecto diferencial en ambas condiciones se detectó respecto del estado de virulencia final de las bacterias. Al inicio de la incubación al pH de muerte las poblaciones bacterianas se encontraban predominantemente en fase virulenta (90% de las bacterias totales), mientras que al finalizar el período de incubación, la fase predominante tanto para las bacterias que provenían de un cultivo a pH: 7,20 como a pH: 5,50, fue la fase avirulenta. En la Figura 2.5 se encuentran representadas las proporciones de las dos fases a lo largo de la incubación en el pH de muerte.

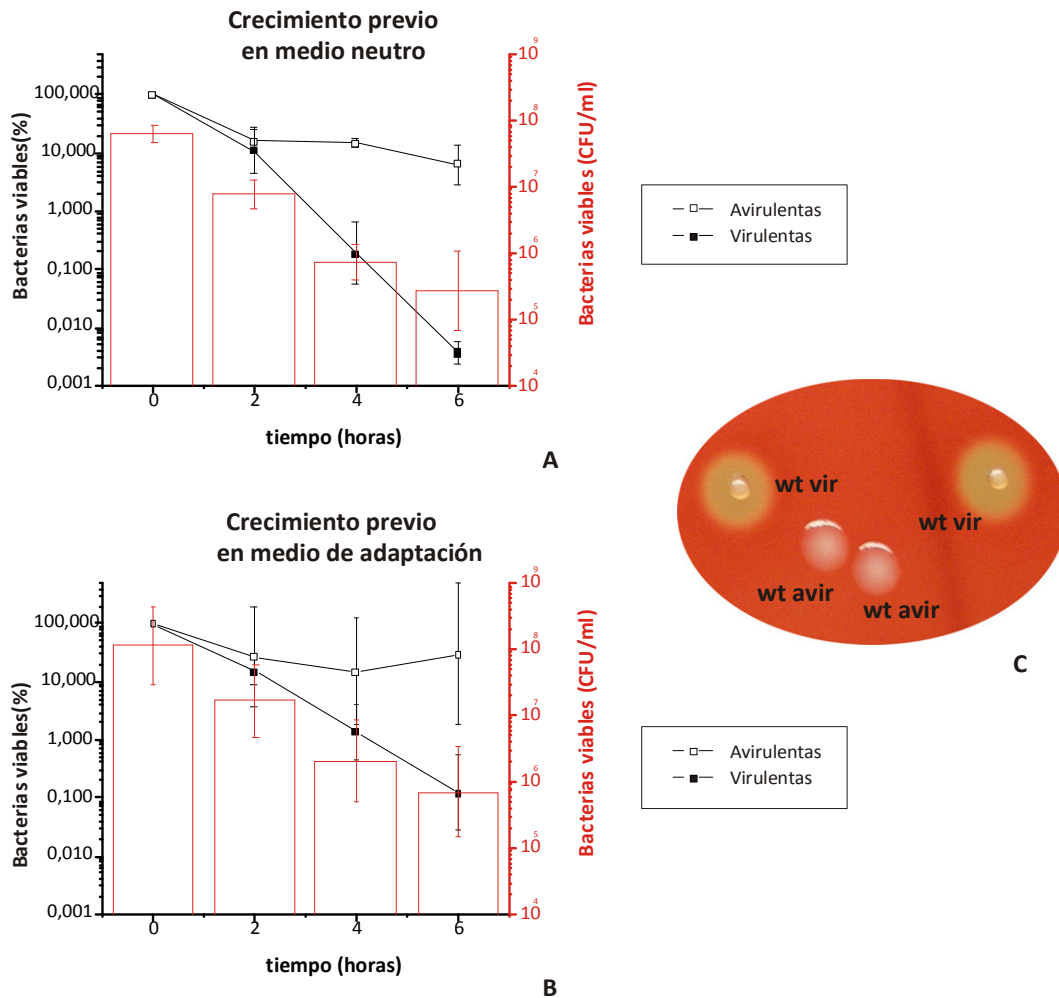


Figura 2.5 Distribución de las bacterias sobrevivientes al pH de muerte de acuerdo a su fase de virulencia.

En ambos paneles se representan las proporciones de la fase de virulencia/avirulencia para las bacterias que sobrevivieron al pH de muerte. Panel A incluye los datos obtenidos cuando el cultivo previo al de muerte se realizó a pH: 7,20 y panel B cuando el cultivo previo se realizó a pH: 5,50. En rojo se incluyen los valores de CFU totales. En el panel C se presenta la morfología de colonias en fase virulenta (wt vir) y en fase avirulenta (wt avir) en el medio BGA samgre.

En la Figura 2.5 puede observarse que a pesar de la caída en el número total de bacterias viables, los recuentos de bacterias en fase avirulenta en ambas condiciones de no adaptación/adaptación se han mantenido constantes prácticamente a lo largo de todo el período de incubación. La caída en el número de bacterias viables parecería deberse a la muerte de las bacterias que expresan un fenotipo virulento. No obstante, en principio no podríamos descartar que a consecuencia de la acidez, las bacterias en fase virulenta cambien a fase avirulenta. Más allá de estas posibilidades lo claro es que la expresión del fenotipo avirulento, estaría asociado a una mayor resistencia a la acidez independientemente de las condiciones de crecimiento previo. Más aún el análisis por separado de los recuentos de bacterias en las distintas fases nos permitió visualizar que las bacterias que expresan un fenotipo avirulento presentarían una respuesta del tipo ATR. Esta afirmación se fundamenta en la observación de un

incremento significativo en los recuentos bacterianos a las 6 horas de incubación al pH de muerte en los cultivos provenientes del medio adaptado respecto a los provenientes del medio sin adaptar.

En base a estos resultados a continuación analizamos la cinética de muerte de bacterias en fase virulenta y en fase avirulenta previamente cultivadas en medio a pH: 7,20. Los resultados obtenidos para las bacterias en fase virulenta se compararon con los provenientes de un mismo experimento pero partiendo de bacterias en fase avirulenta (Figura 2.6).

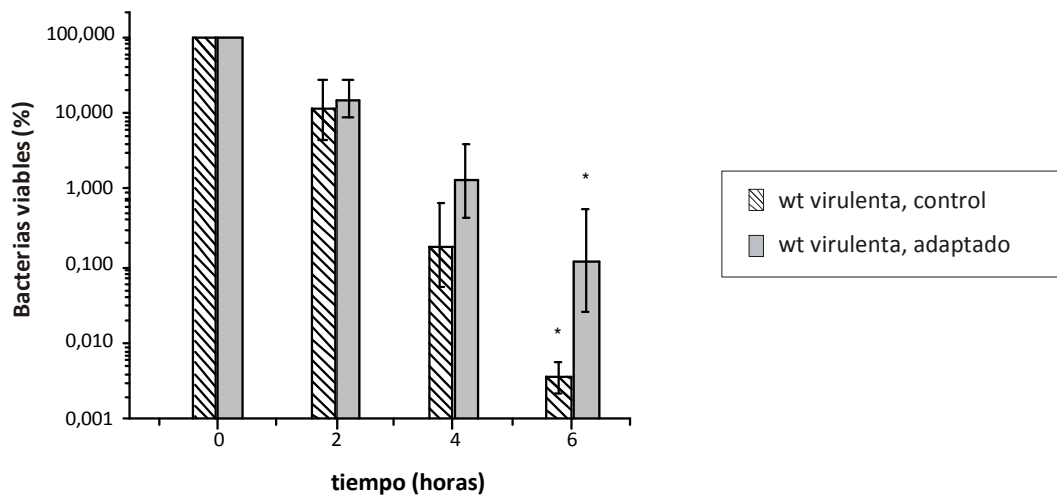


Figura 2.6 Cinética de muerte de bacterias en fase virulenta provenientes de un cultivo a pH: 7,20 (control o no adaptado) o de un cultivo a pH: 5,50 (adaptado).

Los datos representados están expresados en porcentajes referidos al valor observado al inicio de la incubación a pH 4,00. Se muestra el valor medio y las desviaciones estándar. El grado de significación de las diferencias observadas entre grupos fue analizado por el test paramétrico ANOVA y comparación post-hoc mediante el test de Tukey. (*) corresponde a diferencias significativas con $p < 0.01$.

Como puede observarse en la Figura 2.6, existe una diferencia significativa en la sobrevivencia de bacterias virulentas por su exposición previa a un proceso de adaptación por crecimiento en un medio de acidez intermedia. Este efecto se vuelve estadísticamente significativo ($p < 0,01$) luego de 6 horas de exposición al pH de muerte. La caída observada por incubación previa en el medio de adaptación es aproximadamente 1,5 órdenes de magnitud inferior al observado para bacterias provenientes de cultivos no adaptados.

Analizamos luego en forma comparativa la cinética de muerte de bacterias en fase virulenta y avirulenta incubadas en condiciones de no adaptación (pH: 5,50). Los resultados obtenidos se encuentran representados en la siguiente Figura (Figura 2.6).

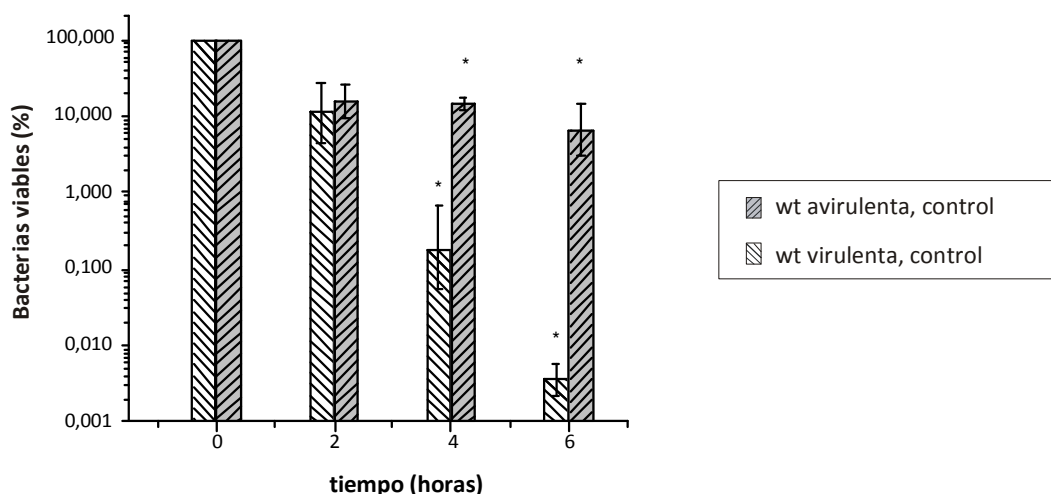


Figura 2.7 Efectos en la cinética de muerte por diferencias fenotípicas de fase.

Los valores incluidos se corresponden a bacterias viables en fase virulenta (▨) o en fase avirulenta (▧). Los valores representados corresponden a las medias de recuentos porcentuales de bacterias viables respecto al valor inicial, para tres ensayos independientes. Se han señalado además las desviaciones estándares de los valores medios. El grado de significación de las diferencias observadas entre grupos fue evaluado por el test paramétrico ANOVA y comparación post-hoc mediante el test de Tukey. (*) indica diferencias significativas en un nivel $p < 0.01$.

La Figura 2.7 permite observar que la diferencia en los recuentos de bacterias viables provenientes de cultivos sin adaptación previa son significativamente superiores para aquellas que muestran un fenotipo avirulento respecto a aquellas fenotípicamente virulentas a partir de las 4 horas de exposición al pH de muerte ($p < 0,01$). Estas diferencias llegan a ser de aproximadamente 3,2 órdenes de magnitud a las 6 horas de exposición. En concordancia con datos reportados para otras condiciones restrictivas de incubación [36], nuestros resultados muestran que la expresión de fase avirulenta otorga una ventaja comparativa frente la exposición a medios de acidez extrema.

En resumen, los resultados mostrados hasta aquí indican que *B. bronchiseptica* en fase virulenta es capaz de desarrollar una respuesta de tipo ATR. Sin embargo esta fase pareciera ser significativamente menos resistente al desafío al pH de muerte que el fenotipo avirulento.

Evaluación de la respuesta ATR de *B. bronchiseptica* en fase avirulenta

Teniendo en cuenta que la fase avirulenta manifiesta una clara resistencia a la acidez, decidimos profundizar el estudio de la respuesta del tipo ATR para esta fase fenotípica. Para ello, decidimos utilizar a un mutante defectivo en la expresión de la proteína BvgA bloqueado en la fase avirulenta. Este mutante fue previamente obtenido por la Dra. J. Fernández en nuestro laboratorio.

Con este mutante analizamos primeramente la cinética de crecimiento en los medios de cultivo a pH: 7,20 y pH: 5,50 de forma de corroborar que para esta cepa el pH: 5,50 permite su crecimiento al igual que ocurría con la cepa en fase virulenta.

El valor de μ (velocidad específica de crecimiento) estimado para el cultivo a pH: 7,20 fue de aproximadamente μ_{BvgA} : 0,381. Este valor resultó próximo al observado para la cepa parental en fase virulenta ($\mu_{vir7,2}$: 0,370). El valor estimado de μ para el mutante en el caso del cultivo a pH: 5,50, representado también en la Figura 2.8, resultó menor al estimado a pH: 7,20. La disminución en el valor μ fue aproximadamente un 27% ($\mu_{bvgA7,2}$: 0,381 y $\mu_{bvgA5,5}$: 0,273 respectivamente). Esta caída en el valor de la velocidad de duplicación conforme al descenso del pH del medio fue inferior a la observada para la fase virulenta (desde $\mu_{vir7,2}$: 0,370 a $\mu_{vir5,5}$: 0,208, una caída del 44% aproximadamente).

Estos resultados nos permiten seleccionar nuevamente al pH: 7,20 y pH: 5,50 como condiciones no adaptación y adaptación respectivamente.

Cuando analizamos la cinética de muerte a pH: 4,00 observamos que las bacterias expresando un fenotipo avirulento no sufren un cambio significativo en su viabilidad (datos no mostrados). Por lo tanto, debimos determinar el pH de muerte para esta cepa mutante. Como resultado de este estudio pudimos determinar que una disminución del pH en 0,20 a partir del valor de referencia de pH: 4,00 (pH: 3,80) resultó apropiada para nuestros objetivos.

Una vez establecido el pH de muerte a emplear, procedimos a evaluar la existencia de respuesta ATR en el mutante bloqueado en fase avirulenta. Las condiciones de crecimiento de los cultivos control y de adaptación fueron las mismas que las empleadas durante el ensayo de ATR en bacterias en fase virulenta. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.9.

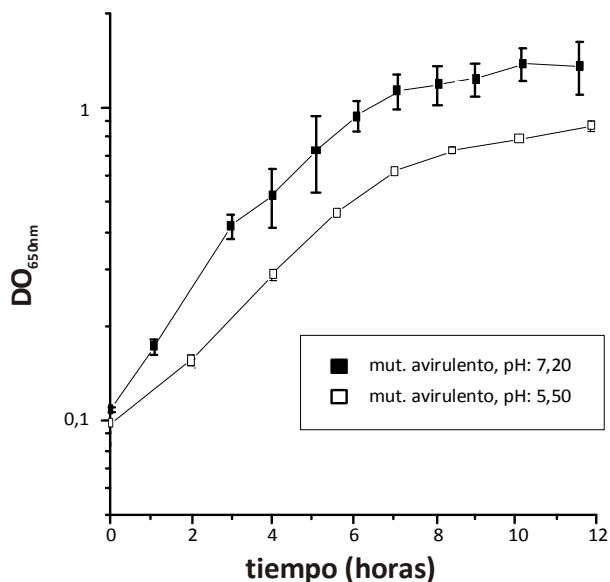


Figura 2.8 Cinética de crecimiento del mutante defectivo en BvgA de *B. bronchiseptica* en fase avirulenta en medio de cultivo a pH: 7,20 y pH: 5,50.

En esta figura se encuentran representadas las cinéticas de crecimiento de bacterias mutantes bloqueadas en fenotipo avirulento, en el medio de cultivo SS a pH 7,20 (■) y pH 5,50 (□). Se han representado los valores de dispersión óptica de luz incidente a 650nm de longitud de onda en función del tiempo, con sus desviaciones estándares. Ha sido graficado un experimento representativo con dos cultivos independientes para cada valor de pH del medio.

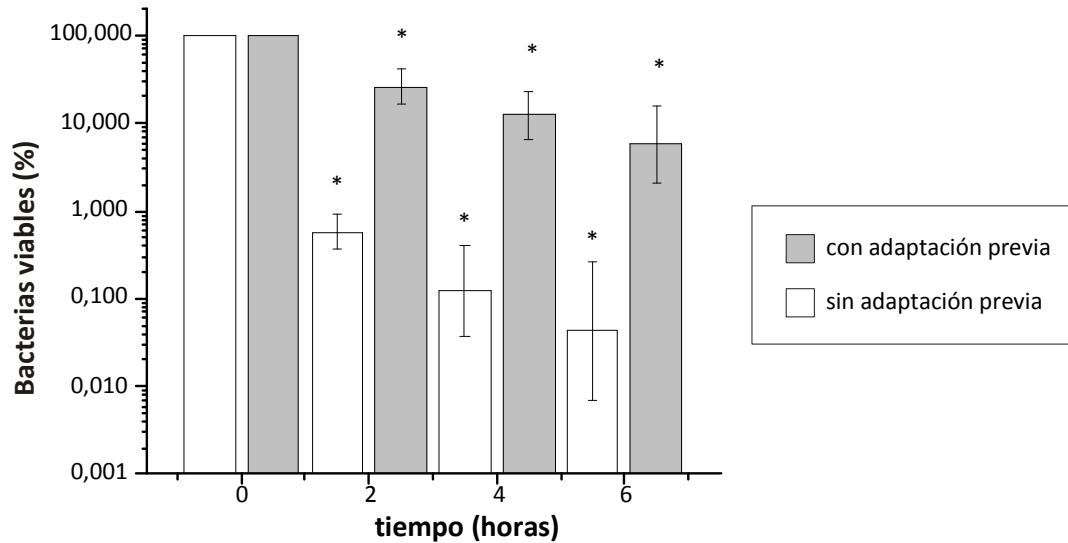


Figura 2.9. Evaluación de la presencia de ATR en mutantes de *B. bronchiseptica* bloqueados en fase avirulenta.

Inóculos bacterianos del mutante Δ BvgA se incubaron en paralelo en medio de adaptación (\square pH: 5,50) y medio de pH neutro (\square pH: 7,20), durante al menos cuatro tiempos de duplicación. Suspensiones bacterianas de células provenientes de estos cultivos fueron empleadas como inóculo para un medio pH: 3,80 (medio de muerte). A los diferentes tiempos de incubación indicados en la figura se realizó un recuento de bacterias viables. En la figura se encuentran representados los valores medios obtenidos de tres ensayos independientes y las desviaciones estándares de los valores medios. Las diferencias que resultaron significativas mediante la prueba T de Student están indicadas con un asterisco (nivel de significación $P < 0.01$).

Como puede apreciarse en la Figura 2.9, el valor de pH de desafío letal de pH: 3,80 ocasiona una disminución de aproximadamente 3,5 órdenes de magnitud en el recuento de bacterias viables a las 6 h para los cultivos bacterianos sin adaptación previa. Por otro lado para las bacterias cultivadas en el medio de acidez intermedia (pH 5,50) se observa una caída del crecimiento mucho menos pronunciada que la detectada para las bacterias cultivadas en condición de no adaptación. Estas diferencias se manifiestan al menos a partir de las dos primeras horas de incubación a pH: 3,80. Así, a la ya conocida adaptabilidad a medios restrictivos de la fase avirulenta se asocia ahora la capacidad de desarrollar una respuesta de tipo ATR.

Resumen de resultados y conclusiones

Trabajos anteriores al nuestro, han demostrado que *B. bronchiseptica* es capaz de sobrevivir a condiciones medioambientales restrictivas e incluso adversas [36, 97, 193, 220]. Dentro de estos trabajos, uno en particular ha abordado el análisis de la acidificación del medio como condición de estrés [97]. En dicho trabajo se muestra que *B. bronchiseptica* posee una mayor capacidad para resistir ambientes ácidos que la especie estrechamente relacionada *B. pertussis*. *B. bronchiseptica* resultó ser capaz de multiplicarse, aunque lentamente, incluso a pH: 4.50, sobreviviendo incluso a valores de pH algo inferiores. Esta resistencia a la acidez es compartida con bacterias alejadas filogenéticamente como las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, reconocidas por ser especialmente resistentes a la acidez extrema [214]. Algunos miembros de esta familia, como *S. typhimurium* se destacan por poseer además una respuesta a la acidez del tipo ATR [206].

En trabajo mencionado [97], los autores Schneider y col. no detectaron el desarrollo de una respuesta de tipo ATR para *B. bronchiseptica*. Sin embargo, una revisión de la literatura al respecto, muestra que la expresión de respuesta ATR posee una amplia dependencia con las condiciones experimentales que se empleen y con las cepas que se ensayen [206-207, 209, 211-213]. Los ensayos aquí realizados nos han permitido verificar esta afirmación.

Más aún, hemos demostrado que tanto el fenotipo virulento como el avirulento son capaces de desarrollar una respuesta del tipo ATR en las condiciones por nosotros ensayadas. Los ensayos realizados a partir del empleo de una cepa bloqueada en la expresión de fenotipo avirulento, han permitido observar una afección menor de las bacterias en fase avirulenta frente a la acidificación del medio en comparación con la cepa parental en fase virulenta (Figura 2.8). Estos resultados están en acuerdo a los reportados para otras condiciones de estrés como ser medios salinos carentes de fuentes de carbono y energía, en donde el fenotipo avirulento se presenta como más resistente [36]. Los resultados aquí obtenidos adjudican así un nuevo rol a la fase avirulenta de *B. bronchiseptica*.

Las cinéticas de muerte representadas en la Figura 2.9 muestran que la adaptación pareciera tener un profundo impacto especialmente durante las dos primeras horas de exposición a la acidez extrema. Una interpretación posible de este hecho es que la bacteria podría requerir de un período de tiempo mínimo de exposición ácida para acomodarse a esa situación de entorno o directamente ser consecuencia de un proceso de selección bacteriana que requiere de un cierto valor de biomasa para comenzar a evidenciarse. El crecimiento previo en un medio de acidez intermedia incrementaría la proporción de bacterias con capacidad de resistir e incluso duplicarse en la condición de pH extrema. Un denominador común a ambas hipótesis es la posible existencia de una asociación entre la expresión molecular de algunos componentes celulares y la resistencia a desafíos de acidez extrema. Es por ello que nuestros estudios posteriores se focalizaron a la identificación y caracterización de los posibles cambios de expresión molecular originados durante el proceso de adaptación a la acidez.

Capitulo 3

Caracterización molecular de la adaptación de *B. bronchiseptica* a la acidez del entorno

Caracterización molecular de la adaptación *B. bronchiseptica* a la acidez

Introducción

Como hemos descrito en secciones anteriores, los microorganismos enfrentan a lo largo de su ciclo biológico un entorno medioambiental cambiante. Para asegurar su persistencia deben por lo tanto ser capaces de detectar estos entornos cambiantes y adaptarse a ellos. En el caso de las bacterias patogénicas de las vías respiratorias en general y en particular aquellas que son además organismos intracelulares facultativos, como es el caso de *B. bronchiseptica*, la exposición a entornos ácidos es una situación que estos deben enfrentar durante el proceso infeccioso. En el capítulo anterior hemos presentado y discutido los resultados obtenidos al analizar el efecto de la acidez en la cinética de crecimiento y muerte de *B. bronchiseptica*. De manera similar a lo observado para otras condiciones restrictivas de cultivo [36, 92], el fenotipo avirulento de *B. bronchiseptica* se presentó como el más resistente a la acidez extrema (AR). De manera complementaria, hemos podido observar también que es en esta fase donde la bacteria puede desarrollar una respuesta de tolerancia a la acidez del medio (ATR).

La siguiente etapa del presente trabajo consistió en la caracterización molecular de *B. bronchiseptica* en el fenotipo resistente a la acidez y capaz de desarrollar una respuesta de tipo ATR como consecuencia de haber sido sometidas a un proceso de adaptación. Específicamente, tratamos de identificar los componentes que resultan propios de este fenotipo. Para ello realizamos análisis comparativos entre los componentes de superficie de bacterias cultivadas a pH:7,20 (no adaptada) y a pH: 5,5 (adaptadas). Para estos análisis empleamos técnicas clásicas como electroforesis y tinciones diferenciales y técnicas más modernas que involucran el empleo de espectrometría de masas del tipo UV-MALDI-ToF y ToF/ToF.

Los resultados alcanzados se presentan a continuación.

Resultados

Efectos de la acidez sobre componentes no proteicos propios de la superficie bacteriana

Debido a que la superficie de la bacteria constituye el primer y principal punto de contacto en la interacción patógeno–medio externo, decidimos analizar de manera comparativa entre las dos condiciones de cultivo, a los constituyentes propios de ese compartimiento bacteriano. En primer lugar analizamos al lipopolisacárido de *B. bronchiseptica* $\Delta bvgA$ tanto en condiciones de no adaptación (pH: 7,20) como de adaptación a la acidez (pH: 5,50). Para ambas condiciones, el LPS se obtuvo mediante una extracción en *batch* con resinas de afinidad (polimixina B) realizada a partir de los sedimentos bacterianos resultantes de dos cultivos secuenciales según se describe en la sección de Materiales y Métodos de este trabajo.

Los LPS extraídos fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en una dimensión y en condiciones desnaturalizantes. La Figura 3.1 muestra por triplicado las corridas electroforéticas obtenidas a partir de LPS propios de cada condición de cultivo bacteriano estudiado.

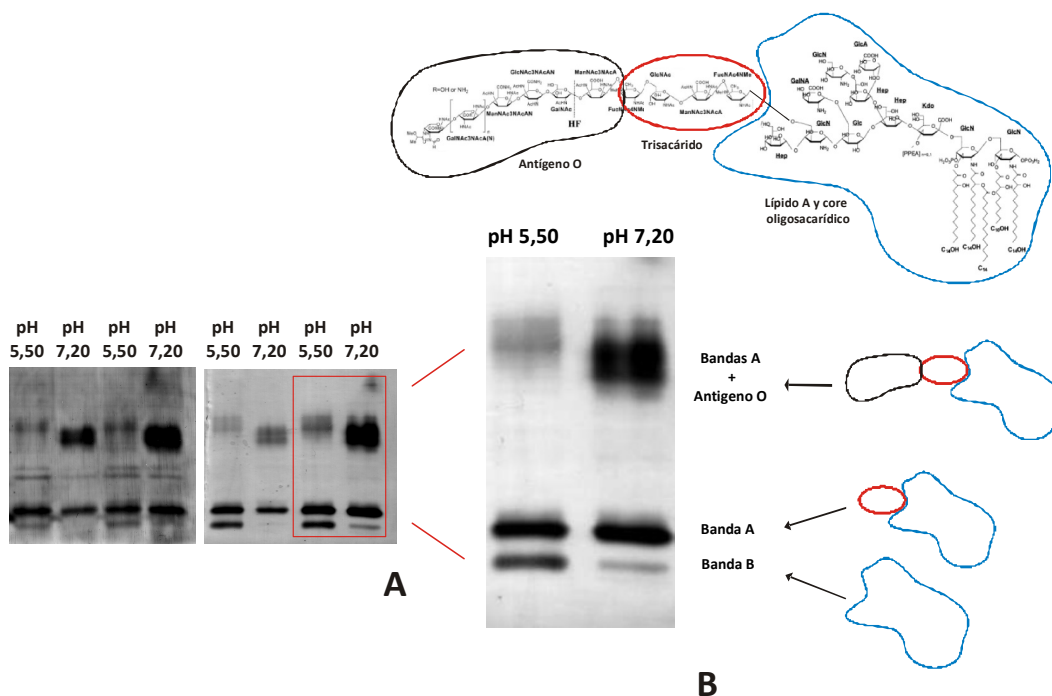


Figura 3.1 Corridas electroforéticas de los LPS de *B. bronchiseptica* obtenidos a partir de cultivos a pH: 7,20 y pH: 5, 50.

En el panel A se muestran las corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE 15%p/v de los LPS obtenidos a partir de cultivos bacterianos crecidos en condiciones de adaptación (5,50) y en medio neutro (7,20). En el panel B se muestra una sección ampliada del gel del panel A, señalando en el lado derecho de la figura la composición química de cada banda. Para la visualización de los LPS se empleó la técnica de tinción con plata (kit comercial de BioRad).

En la Figura se puede observar que las muestras de LPS obtenidas de los dos cultivos presentan las tres bandas características del LPS de *B. bronchiseptica* [221-

222] (panel B): la banda B, de mayor movilidad electroforética que está compuesta por el lípido A y core oligosacárido, la banda A, formada por los componentes de la banda B más el trisacárido indicado en la figura y la banda A con el antígeno O. Este último constituido por homopolímeros del ácido 2,3-dideoxi-2,3-di-N-acetilgalactosaminurónico (2,3-di-NAcGalA) (I-GalNAc3NAcA), a cuyo extremo no reducido se une el 2,3,4-trideoxi-2,3,4-triamino galacturonamida (GalN3N4NAN) [126, 222].

En la Figura 3.1 se observa además que los LPS extraídos a partir de bacterias cultivadas en el medio de pH: 7,20 difieren cuali y cuantitativamente de los correspondientemente obtenidos a pH: 5,50. En el medio ácido (indicado como calle pH: 5,50), se observa una mayor proporción de la banda B y una menor cantidad antígeno O que el observado en el medio neutro (indicado como calle pH: 7,20). Más aún, el antígeno O de los LPS provenientes de cultivos a pH: 5,50 posee una movilidad electroforética menor comparada con los obtenidos de los cultivos de pH neutro. El retraso en la movilidad electroforética podría deberse a una mayor longitud de los oligosacáridos que lo componen o de una menor carga negativa en los azúcares modificados que lo constituyen. Mas allá de las posibles causas de los cambios, las modificaciones en uno y otro LPS son claras.

Efectos de la acidez sobre componentes proteicos de *B. bronchiseptica*

En la actualidad se dispone del conocimiento del genoma de *B. bronchiseptica* RB50 (5,3 Mpb; 4961 ORF) [98] y de anotaciones funcionales de los correspondientes genes (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=taxonomy:518>). La accesibilidad de ésta información, en combinación con las tecnologías de análisis de proteínas por espectrometría de masa (MS), como la “desorción/ionización matriz asistida, inducida por láser” (MALDI), permiten una rápida identificación de proteínas. Dado que ello es justamente nuestro objetivo, estas metodologías que asocian electroforesis, espectrometría de masa y bioinformática, fueron incorporadas en nuestros estudios.

Dicha incorporación implicó la optimización de las metodologías de forma de ajustar diferentes condiciones de operación para obtener e identificar el mayor número posible de proteínas (*spots*) presentes en los geles 2D-PAGE. A continuación se detallan las condiciones ajustadas.

Optimización de la metodología Proteómica

Fraccionamiento subcelular y solubilización de los extractos proteicos

El material de partida para nuestro análisis, fue obtenido en las mismas condiciones que para el LPS, es decir a partir de dos cultivos secuenciales de la cepa *B. bronchiseptica* $\Delta bvgA$. Los cultivos bacterianos se realizaron tanto en condiciones de adaptación (pH: 5,50) como en medio de pH cercano a la neutralidad (pH: 7,20), durante al menos dos tiempos de duplicación. Transcurrida la incubación, las células fueron cosechadas mediante centrifugación. A partir de estas células se realizaron diferentes ensayos con el fin obtener de manera representativa a las proteínas que constituyen la superficie de la bacteria (fracciones enriquecidas en **proteínas externas** o **de membrana, FCS**) y el citoplasma (fracciones enriquecidas en **proteínas citoplasmáticas, FCP**). En la Figura 3.2 se muestra la distribución porcentual de las proteínas en los distintos compartimientos. Estas proporciones fueron estimadas a partir del conocimiento de la secuencia del genoma de la cepa de *B. bronchiseptica*

RB50 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y del software Psortb versión 3.0 (<http://www.psort.org/psortb/>).

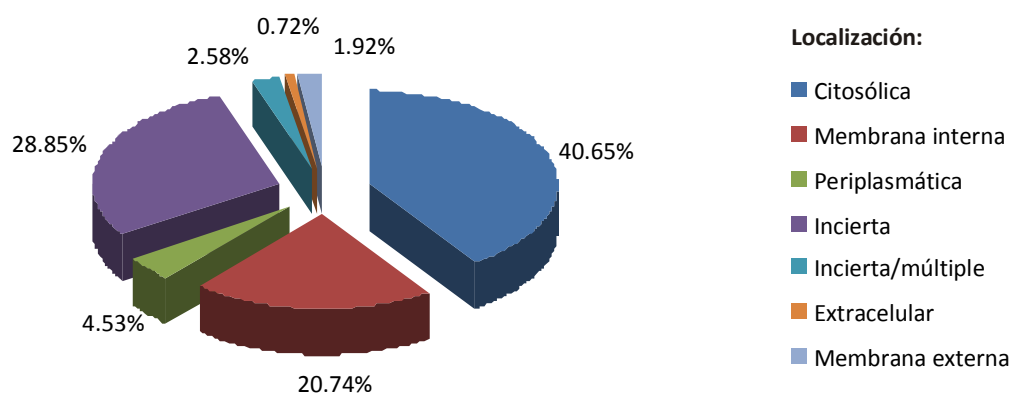


Figura 3.2 Predicción de la localización subcelular de las proteínas de *B. bronchiseptica*.

En esta figura se encuentra representada localización subcelular de las proteínas predichas a partir del conocimiento del genoma de la cepa de *B. bronchiseptica* RB50. Las localizaciones fueron asignadas mediante el empleo del software PSORTb 3.0. Las proteínas pertenecientes a cada fracción subcelular se expresa de manera porcentual respecto al número total de posibles secuencias codificantes en el genoma.

Estos datos resultan interesantes ya que nos dan idea de la cantidad de proteínas diferentes que tendríamos que detectar y en lo posible identificar, en los compartimentos que consideramos constituyentes de la superficie bacteriana (membrana externa, membrana interna, periplasma) y los de la fracción citoplasmática.

Para la obtención de los componentes proteicos de la superficie bacteriana empleamos una metodología que incluyó una etapa de ruptura celular por sonicación y un proceso secuencial de centrifugación y ultracentrifugación. La etapa final de solubilización consistió un desafío en sí mismo debido a la escasa solubilidad de las proteínas de naturaleza hidrofóbica contenidas en la superficie. El desafío estaba referido a la limitación de los buffers a utilizar ya que además de permitir la solubilización de las proteínas, los mismos tienen que ser compatibles con la electroforesis de la primera dimensión, es decir el isoelectroenfoque (IEF) [223].

Así por ejemplo no se pueden emplear detergentes tan nobles como el dodecil sulfato de sodio (SDS). Ello nos ha llevado a ensayar la incorporación de surfactantes zwitteriónicos como el 3-[(3-colamidopropil) dimetilamino]-1-propan-sulfonato (CHAPS) y

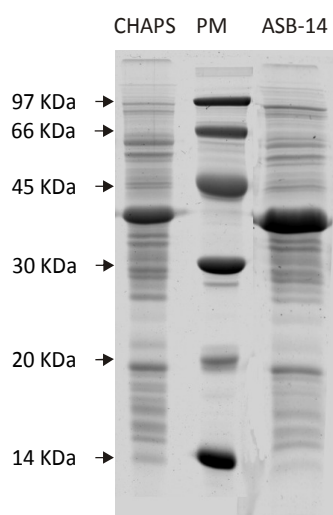


Figura 3.3 Comparación de buffers de solubilización para proteínas no citosólicas mediante electroforesis en gels 1-DE.

Se emplearon dos buffers con igual concentración de agentes caotrópicos (Urea 7M y Tiourea 2M) pero diferentes detergentes CHAPS 4% y ASB-14 1% según se indica en la figura. La electroforesis fue realizada sobre un gel de 15% p/v. La visualización de proteínas se realizó mediante la técnica Coomassie G-250.

la amido-sulfobetaina 14 (ASB-14) a la mezcla que contiene como agentes caotrópicos a la urea y tiourea. El empleo de estas sustancias nos ha permitido lograr no solo una buena solubilización sino además una buena resolución en los geles como puede observarse en la Figura 3.3. En dicha Figura podemos observar además que los perfiles de resolución de los extractos con ambos surfactantes son similares. Teniendo en cuenta este resultado y el elevado costo del detergente ASB-14 decidimos seleccionar al CHAPS en una concentración del 4%p/v para adicionar a la mezcla de caotrópicos urea 7M y tiourea 2M.

En el caso de los extractos enriquecidos en proteínas citosólicas empleamos un buffer similar al anterior pero con una menor concentración del surfactante CHAPS (2 %p/v).

La eficacia del proceso de enriquecimiento diferencial en proteínas de diferente localización, fue evaluada mediante la comparación de los perfiles proteicos en geles SDS-PAGE en una dimensión. En la Figura 3.4 se muestran corridas electroforéticas de cada extracto para las condiciones de pH estudiadas en nuestro trabajo.

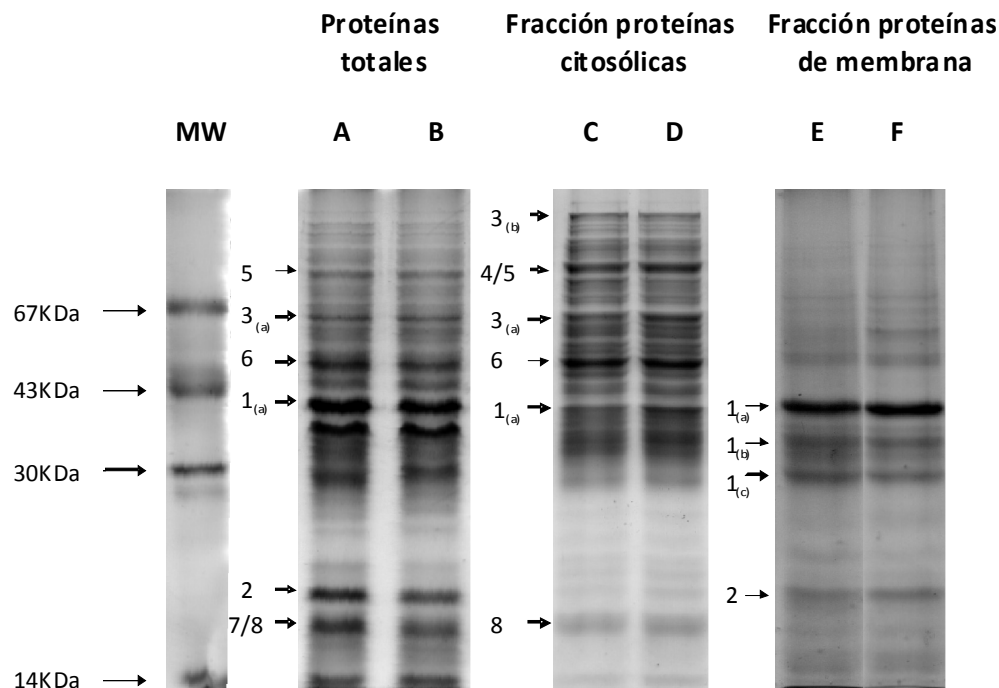


Figura 3.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%p/v) de diferentes fracciones subcelulares de *B. bronchiseptica* delta *bvgA* cultivada en diferentes pH.

Las fracciones provenientes de cultivos celulares a pH: 5,50 se incluyeron en las calles A, C y E, mientras que las provenientes de los cultivos a pH: 7,20 calles B, D y F. La visualización de proteínas se realizó mediante tinción con Coomassie R-250. La identidad de las bandas señaladas con una flecha se detalla en la Tabla 3.2.

Como se observa en la Figura 3.4, la estrategia de enriquecimiento diferencial empleada ha permitido la obtención de fracciones proteicas diferentes para cada compartimento. Así, el extracto correspondiente a proteínas totales contiene la mayoría de las bandas observadas tanto en los extractos enriquecidos en proteínas citosólicas como en el extracto de proteínas no citosólicas (Figura 3.4). A su vez se

puede observar que los perfiles electroforéticos enriquecidos de cada fracción subcelular resultaron ser similares para las muestras provenientes del cultivo a pH: 7,20 y a pH: 5,50.

Para evaluar si las diferencias observadas responden a la diferente localización de las proteínas, determinamos la identidad y la localización de las proteínas que componen las bandas mayoritarias de cada fracción (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Identificación de proteínas de las diferentes fracciones proteicas de *B. bronchiseptica* mediante electroforesis asociada a espectrometría de masa UV-MALDI

Fracción	Proteína	Descripción / Función	Localización (pSortb versión 3.0)	Peso molecular estimado (Da)
1(a,b y c)	BB3842	Porina de membrana externa	Membrana externa	41278
2	BB3474	Porina de membrana externa OmpA	Membrana externa	21099
3 (a y b)	BB0962	Proteína chaperona GroEL	Citoplásmica	57447
4	BB2079	5-metil-tetrahidropteroil-triglutamate/homocisteína metil transferasa (MetE)	Citoplásmica	84735
5	BB0026	Factor de elongación G (FusA)	Citoplásmica	77324
6	BB0027	Factor de elongación Tu (EFTu)	Citoplásmica	43003
7	BB4356	Proteína ribosomal S9 (RpsI)	Citoplásmica	14501
8	BB0963	Proteína chaperona GroES	Citoplásmica	10266

La banda 1 de la Figura 3.4 es una de las bandas mayoritarias tanto en los extractos de proteínas totales como en los extractos enriquecidos en proteínas de membrana. Según se detalla en la Tabla 3.1, esta banda se encuentra compuesta por la proteína BB3842. En los extractos enriquecidos en proteínas citosólicas (FPC) esta banda es minoritaria, lo cual concuerda con lo esperado, dado que se trata de una porina con localización en la membrana celular externa. La distribución de la banda 2 entre las diferentes fracciones, representa un caso análogo al anterior. Esta banda se corresponde a la proteína porina OmpA cuya localización nuevamente, de acuerdo al programa PSORTb 3.0, sería la de membrana externa.

Las bandas 3 y 6 se corresponden a la chaperona GroEL y el factor de elongación Tu, respectivamente. Ambas proteínas tienen una localización preferencialmente citosólica, lo cual concuerda con lo observado de manera diferencial en las distintas fracciones, siendo más abundantes en las FPC. Las bandas 1b y 1c (peso molecular estimado experimental de 35,6 y 31,0 kDa, respectivamente) se corresponderían a los productos de la degradación de la proteína BB3842, (banda 1a, peso molecular experimental estimado de 41,3 kDa). La banda 3b (peso molecular estimado de 92,0 kDa), por el contrario estaría compuesta por agregados de, al menos, la proteína GroEL (peso molecular experimental estimado de 59,8 kDa).

Por otra parte, cuando comparamos los perfiles de las distintas fracciones provenientes de las bacterias incubadas en ambas condiciones de cultivo, no observamos diferencias apreciables. Esto es esperable si se tiene en cuenta la baja capacidad de relativa de resolución de la técnica SDS-PAGE en una sola dimensión.

A continuación presentamos la optimización y los resultados que obtuvimos al aplicar la metodología electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE a partir de extractos proteicos de *B. bronchiseptica*.

Resolución de los extractos proteicos en geles 2D-PAGE

Para los extractos enriquecidos en proteínas de superficie empleamos rangos de pHs amplios en el isoelectroneo de forma de incluir la separación de un número importante de proteínas. Específicamente, empleamos dos rangos de pH, de pH: 4 a pH: 7 y de pH: 6 a pH: 11. Para este último rango de pHs, incorporamos al agente comercial DeStreak (Bis[2-hidroxietil] disulfuro, HO-CH₂-CH₂-S-S-CH₂-CH₂-OH) en lugar del agente reductor Ditiotretitol (DTT, HS-CH₂-CH(OH)-CH(OH)-CH₂-SH) según lo recomendado para mejorar el enfoque de proteínas alcalinas [224]. Para estas fracciones bacterianas evaluamos la introducción de un paso de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) siguiendo recomendaciones difundidas en bibliografía [225]. Este paso de precipitación según los datos de cuantificación proteica antes y después de la precipitación, no llevó a pérdidas significativas de proteínas (datos sin mostrar) y mejoró cuali y cuantitativamente la resolución de los FPS en los geles 2-DE sin alterar el perfil proteico (Figura 3.5)

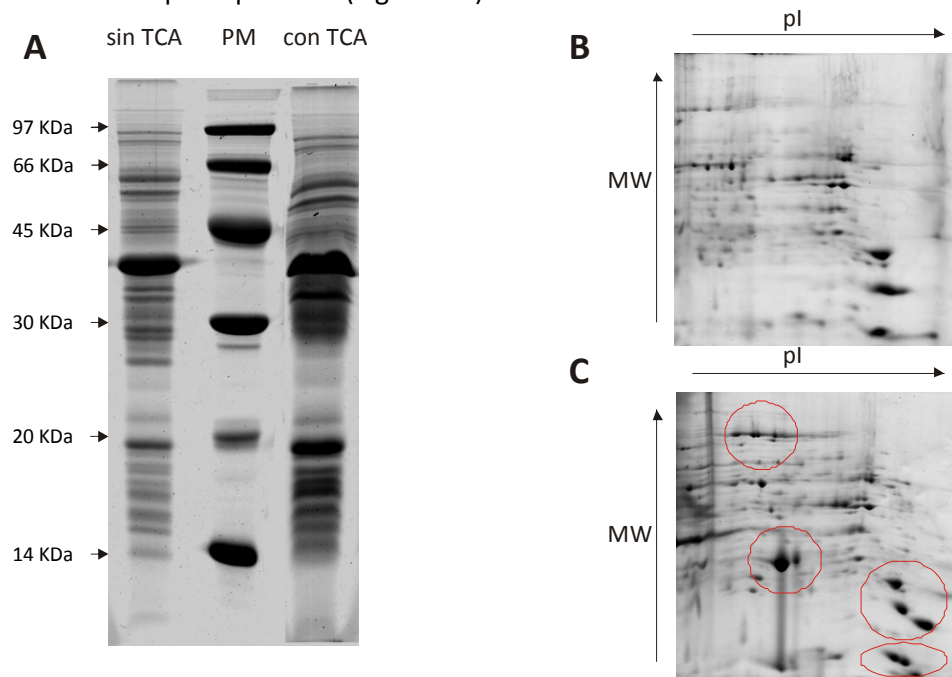


Figura 3.5 Resolución electroforética uni (1-DE) y bidimensional (2-DE) de FPS de *B. bronchiseptica*. Efecto de la precipitación con TCA.

La electroforesis 1-DE fue realizada en condiciones desnaturizantes sobre un gel de poliacrilamida de 12,5% p/v (panel A). En el panel A se muestran los resultados de la electroforesis 2D-PAGE, empleando un rango de resolución de pI entre 6 y 11 durante el IEF (Immobiline Dry-strip®, GE Healthcare). La concentración de acrilamida en los geles de la segunda dimensión fue 12,5% p/v. En el panel B se presenta una foto representativa de las electroforesis 2D-PAGE realizadas a partir de muestras sin la etapa de precipitación con TCA y en el panel C se corresponde a corridas 2D-PAGE de muestras precipitadas con TCA. Las diferencias entre las observadas en el panel B y en el C son señaladas en rojo. La visualización de proteínas se realizó mediante la técnica Coomassie G-250 coloidal.

Para los extractos enriquecidos en proteínas citosólicas también realizamos optimizaciones ya que estas fracciones cuentan con mayor cantidad de proteínas diferentes. Para lograr una buena resolución de las proteínas contenidas en dicha

fracción empleamos para el IEF tiras comerciales de mayor longitud y para los geles de la segunda dimensión empleamos geles de mayor tamaño. Para el IEF ensayamos además diferentes técnicas de siembra de la muestra: *in-gel rehydration* (Figura 3.6 Panel A) y *anodic cup-loading* (Figura 3.6 Panel B). En el primero, la muestra se mezcla con el buffer conteniendo los anfolitos y se coloca sobre la tira (IPG) durante toda la noche. Este paso se realiza antes del isoelectroenfoque de forma que las proteínas estén dentro de la matriz acrilamida-anfolitos del IPG cuando el IEF se inicie. En la segunda, la muestra de proteínas ya solubilizadas en buffer de resuspensión se deposita dentro de un recipiente denominado copa, en contacto con el extremo anódico de una tira de IEF previamente hidratada con buffer de siembra. La introducción de la muestra a la tira de IEF se efectúa mediante la aplicación de una diferencia de potencial. Los resultados obtenidos con las dos técnicas de siembra se muestran a continuación.

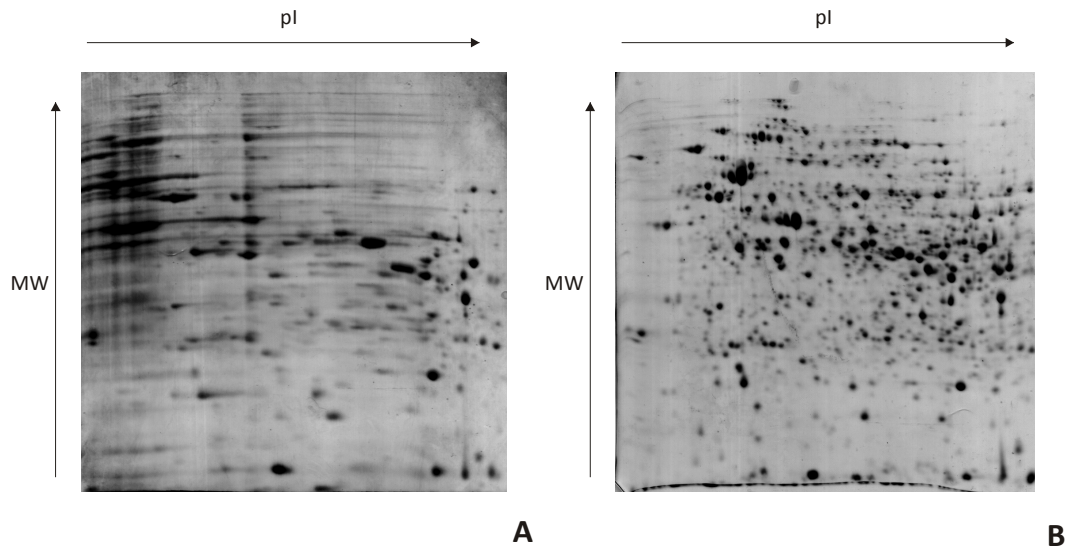


Figura 3.6 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas de la fracción citosólica de *B.bronchiseptica*.

En el panel A se muestra los resultados obtenidos al emplear el método *in gel-rehydration* para la carga de muestra, mientras que en el panel B se muestra el resultado obtenido al emplear la metodología *anodic cup-loading*. En ambos casos para el isoelectroenfoque (IEF) se empleó una tira IPG pH 4-7, de 18 cm y el equipo IPGphor. La cantidad de muestra sembrada en los dos casos fue de 400 μg de proteínas citosólicas. La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE 12,5 % p/v. La visualización de proteínas fue realizada mediante la técnica Coomassie G-250 coloidal.

Como puede observarse en la Figura 3.6, para las muestras FPC (fracción citoplasmática) el método de carga *anodic cup-loading* resultó más efectivo en cuanto a resolución y focalización de las proteínas en el IEF con tiras de rango pH: 4-7. Su efectividad probablemente se relaciona con el modo en que las proteínas ingresan al IPG durante el IEF. La transferencia de proteínas desde la copa hacia el IPG es gradual, lo cual evita la precipitación de proteínas y favorece su enfoque. La introducción de la muestra al gel desde el ánodo minimiza la interferencia de impurezas con carga negativa, como por ejemplo DNA.

Análisis comparativo entre las distintas fracciones de *B. bronchiseptica* delta *bvgA* obtenidas en distintas condiciones de pH

Optimizadas las metodologías, procedimos al análisis de las distintas fracciones provenientes de los cultivos realizados a los dos pHs de estudio.

Los perfiles que se obtienen para las distintas fracciones se muestran a modo de ejemplo en la Figura 3.7.

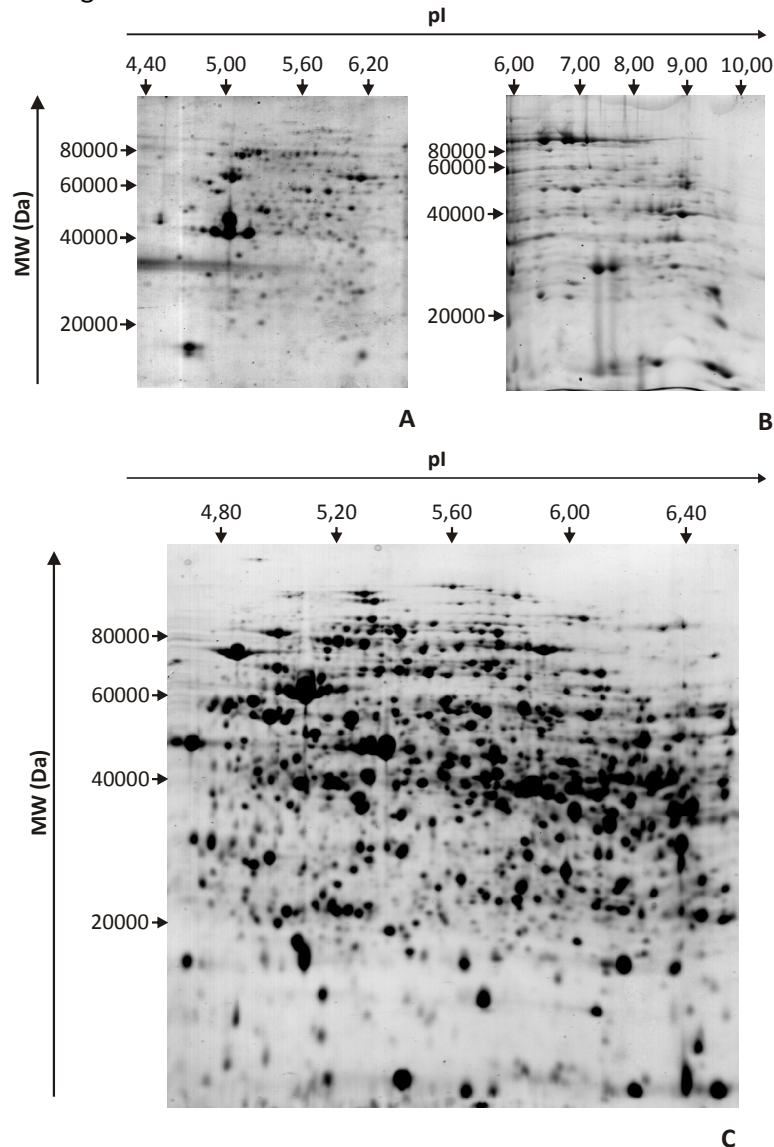


Figura 3.7. Electroforesis 2D-PAGE de extractos proteicos de *B. bronchiseptica*.

En la presente figura se muestra geles representativos de las electroforesis 2D-PAGE realizadas sobre los extractos enriquecidos en proteínas de membrana (Paneles A y B) y citosólicas (Panel C). Para el caso de los FPS se han empleado dos rangos de pH de separación durante el IEF, esto es pH entre 4 y 7 (Panel A) y entre 6 y 11 (Panel B). En ambos casos la longitud de las tiras comerciales usadas fue de 7 cm. Para el caso de las FPC (Panel C), se han empleado IPG 4 a 7 de 18 cm, descartándose 4 cm del extremo anódico una vez finalizado el IEF y previo a la realización de la segunda dimensión. La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE 12,5 % p/v. La visualización de proteínas se realizó mediante la técnica Coomassie G-250 coloidal. Las imágenes mostradas son representativas de al menos tres separaciones independientes.

Como puede apreciarse en la figura anterior la resolución de las proteínas correspondientes a las fracciones citoplasmáticas fue superior a la de las fracciones de superficie (FPS). Por otra parte, las resoluciones de las FPS en el IEF con un rango de pI entre 6 y 11 han sido las más trabajosas durante el proceso de optimización. Más allá de las dificultades, la resolución alcanzada para estas muestras ha permitido detectar diferencias entre los extractos provenientes de las 2 condiciones de cultivo como describiremos en la siguiente sección.

Algoritmo de análisis comparativo entre los proteomas obtenidos

Luego de haber logrado una resolución satisfactoria de las proteínas para ambos compartimientos subcelulares, procedimos a trabajar con las fracciones proteicas citosólicas (FPC) y de superficie (FPS), provenientes de cultivos de *B. bronchiseptica* bloqueada en la expresión de fenotipo avirulento, tanto a pH : 7,20 como a pH : 5,50 (FPC_{7,20}, FPS_{7,20} y FPC_{5,50} y FPS_{5,50}). Para cada fracción subcelular y para cada condición de pH , realizamos al menos 3 preparaciones independientes de los extractos proteicos. Las imágenes de los geles 2D-PAGE obtenidos a partir de estas muestras, fueron digitalizadas y posteriormente analizadas mediante el software Image master 6.0 Platinum®. El análisis realizado con este programa involucra un primer paso de detección de los *spots* presentes en cada gel particular, descartando o minimizando la presencia de los artefactos más evidentes (burbujas, depósitos de colorante, etc.). Esto se hace inicialmente mediante la inspección visual de las imágenes y el ajuste de parámetros propios de la definición de *spot*. Una vez eliminados de los geles los artefactos definidos en el programa, seleccionamos entre las réplicas de geles un gel al que denominamos gel de referencia (Figura 3.8). El gel seleccionado dentro de cada grupo se correspondió con aquel que presentó un mayor número de *spots* resueltos. A partir de este gel de referencia realizamos un proceso de asociación entre los *spots* de los geles que conforman cada grupo, por similitud en la localización espacial de los *spots*. Este procedimiento se conoce con el nombre de *matching* y al haber sido realizado sobre geles provenientes de una misma condición de cultivo bacteriano, lo llamaremos *matching* intracondición (Figura 3.8).

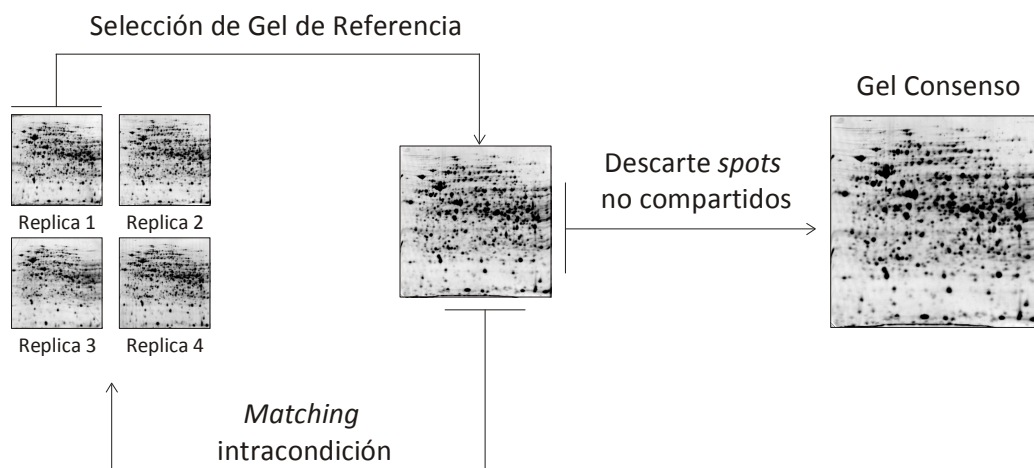


Figura 3.8 Procedimiento para la obtención de los geles 2D-PAGE consenso de *B. bronchiseptica* cultivada en una condición de pH .

Mediante el proceso de *matching* anterior pudimos asociar en promedio un 27% de los *spots* presentes en las FPS resueltas mediante un gradiente de pH en el IEF de 4 a 7. Este valor de asociación fue similar independientemente de la condición de pH del cultivo bacteriano de partida. Para el caso de los FPS resueltos en un gradiente de pH de 6 a 11, pudieron ser asociados el 47% de los *spots*, nuevamente observando resultados comparables independientemente del cultivo bacteriano inicial. Finalmente para el caso de las FPC, la proporción de *spots* asociados del 63%. Nuevamente y en concordancia con las FPS este valor permaneció invariable para los extractos provenientes de ambas condiciones de cultivo bacteriano. A continuación, realizamos un nuevo proceso de *matching* pero en esta oportunidad del tipo intercondición. Esto es, asociamos los *spots* presentes en los geles de referencia de un mismo tipo de extracto (FPS o FPC), resueltos en las mismas condiciones (IEF con rango de pH: 4-7 ó pH: 6-11) pero provenientes de diferentes condiciones de pH en el cultivo original (pH: 5,50 ó pH: 7,20). Mediante esta operación pudimos observar una asociación entre los *spots* intercondición en proporciones equivalentes a las observadas intracondición. En base a ello, consideramos que este material resultaba adecuado para continuar con los análisis comparativos.

Tomando como partida cada gel de referencia, construimos geles a los que denominamos geles consenso, considerando sólo aquellos *spots* presentes en todos los geles réplicas (Figura 3.8). Este procedimiento permitió descartar los *spots* que aparecían de manera aleatoria en los extractos junto a los artefactos aún no descartados. Así, el gel consenso para la FPS_{5,50} con proteínas de pI entre 4-7 fue conformado por el 12,9% de los *spots* presentes en el gel de referencia (79 de 613) mientras que las FPS_{5,50} con proteínas de pI entre 6-11 y FPC_{5,50} quedaron representado por el 29,5% (156 de 528) y el 44,2% (618 de 1397) de los *spots*, respectivamente. Por su parte, para la condición de pH 7,20, los geles consenso de los grupos FPS_{7,20} pI 4-7, FPS_{7,20} pI 6-11 y FPC_{7,20} contienen el 16,4% (83 de 505), 26,9% (139 de 517) y 42,8% (620 de 1447) de los *spots* originales, respectivamente. Como se desprende de los valores anteriores, los geles consenso de las FPS se encuentran conformados por una proporción de *spots* originales inferior a la de las FPC. Esto pareciera obedecer a varias causas, dentro de las que podemos mencionar a un mayor bandeo horizontal por efecto de la baja solubilidad de sus péptidos componentes. No obstante, el número de *spots* presentes en los geles consenso parece corresponderse con lo observable por simple inspección ocular.

Analizamos luego la distribución de los volúmenes de los *spots* incluidos en el gel consenso de manera de validar luego las comparaciones que realizamos a partir de los geles que hemos denominado consenso. Los datos obtenidos los mostramos en la siguiente Figura:

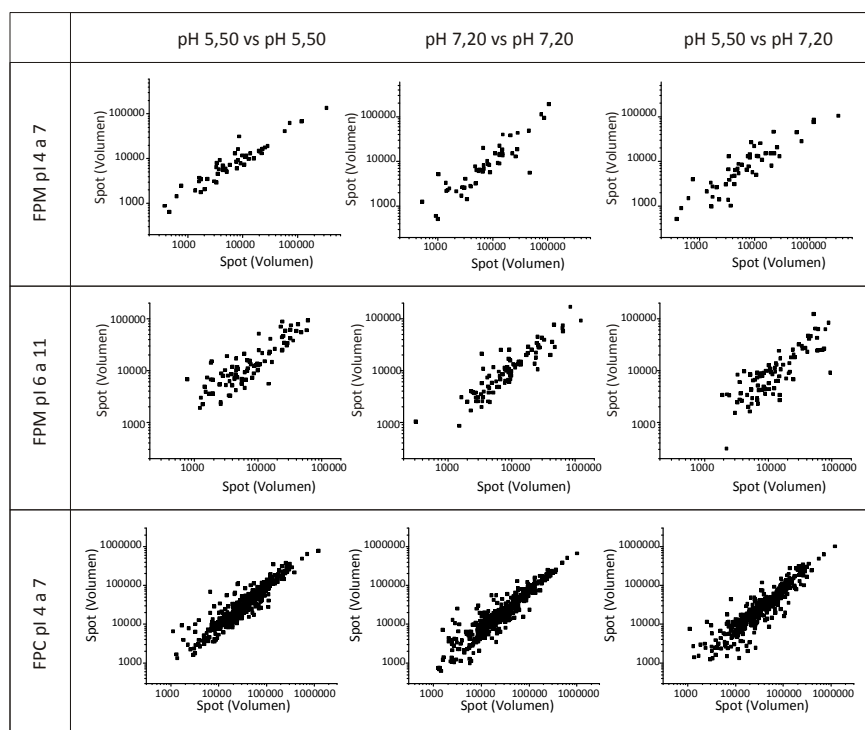


Figura 3.9. Distribución comparativa de los volúmenes de los *spots* en los distintos geles 2D PAGE para cada condición de pH analizada.

Para las distintas fracciones FPC, FPS de pl 4 a 7 y FPS pl 6 a 11 se representaron los volúmenes calculados por el programa para cada uno de los *spots* detectados en cada condición. Para cada grupo de geles de cada condición se han efectuado comparaciones en la distribución de volúmenes intracondición (pH 5,50 vs pH 5,50 y pH 7,20 vs pH 7,20) y también entre condiciones (pH 5,50 vs pH 7,20).

Como podemos observar en la Figura 3.9, la distribución de los volúmenes de los *spots* compartidos por la totalidad de los geles intracondición (*spot* consenso) resultó ser comparable a su equivalente intercondición. Esto valida en alguna medida las comparaciones que haremos entre geles, fracciones y condiciones.

Evaluación global del comportamiento experimental de las variables pl y MW en los geles 2D-PAGE.

Antes de abordar los análisis comparativos entre las condiciones de cultivo estudiadas para *B. bronchiseptica* realizamos un último análisis general del comportamiento de nuestros geles 2D-PAGE. Habiendo identificado por medio de la espectrometría de masas UV-MALDI Tof/Tof 37 *spots* de las FPS y 61 *spots* de las FPC, (ver secciones posteriores, Tablas 3.2 y 3.3), la disponibilidad de sus secuencias peptídicas en base de datos nos permitió obtener un valor teórico de los parámetros fisicoquímicos punto isoeléctrico (pl) y peso molecular (PM o MW) esperados. La comparación de los valores teóricos con los determinados experimentalmente en función de su posición en los geles nos permitió analizar el comportamiento global de la resolución obtenida.

Para el caso de los valores de pl, en la Figura 3.10 se representa el grado de correspondencia entre los valores teóricos de los péptidos identificados y los experimentales.

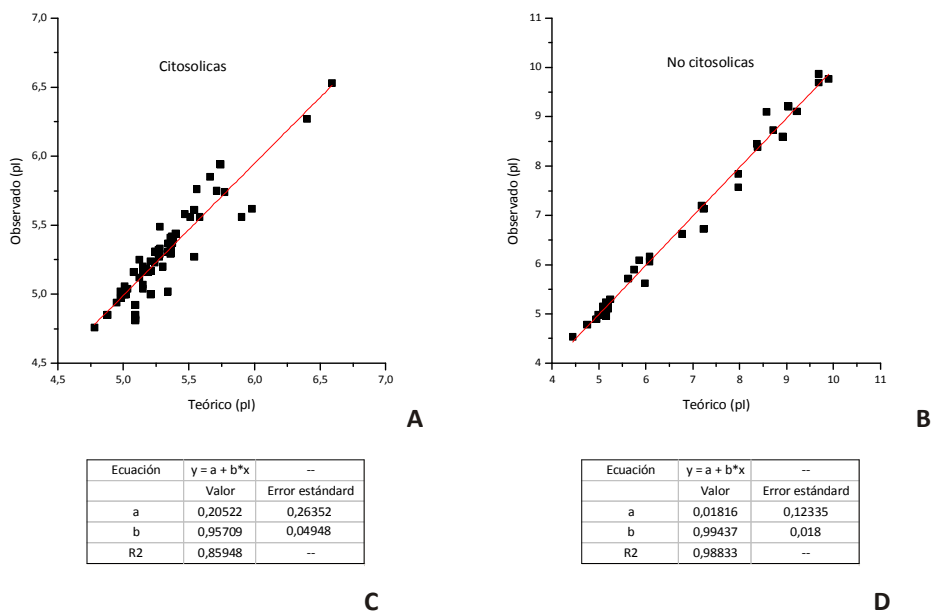


Figura 3.10 Correlación entre los valores de pI teóricos y experimentales.

En la figura hemos representado los valores de pI de las proteínas teóricos calculados a partir de su secuencia de aminoácidos, en función de los observados experimentalmente en los gels consenso de FPC y FPS. Los datos de la regresión lineal por el método de los cuadrados mínimos se muestran en la Tablas C y D de la presente figura.

Como puede observarse en esta figura, los valores de pI teóricos no difieren apreciablemente de los valores experimentales. Más aún, habiendo observado una correspondencia casi lineal entre ambos valores, un análisis de correlación nos muestra un R^2 de 0,854948 y 0,98833 para FPC y FPS, respectivamente (Figura 3.10, Tablas C y D). Esto sugiere la validez de la técnica de resolución e identificación empleadas.

Analizamos luego la correlación entre los PM teóricos y los experimentales. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.11. Pudimos observar una buena correlación para valores de PM comprendidos entre 40 y 70 KDa, pero para los valores de PM inferiores y superiores a estos, los datos experimentales fueron menores que los teóricos (Figura 3.11). Estas observaciones podrían obedecer a la ineffectividad del gel en separar macromoléculas pequeñas y grandes que requerirían otro grado de entrecruzamiento de la malla del gel y un tiempo mayor para separarse. El tiempo de corrida representa un compromiso entre la pérdida de las proteínas de menor tamaño molecular del gel y la pérdida de resolución en las proteínas de alto tamaño molecular.

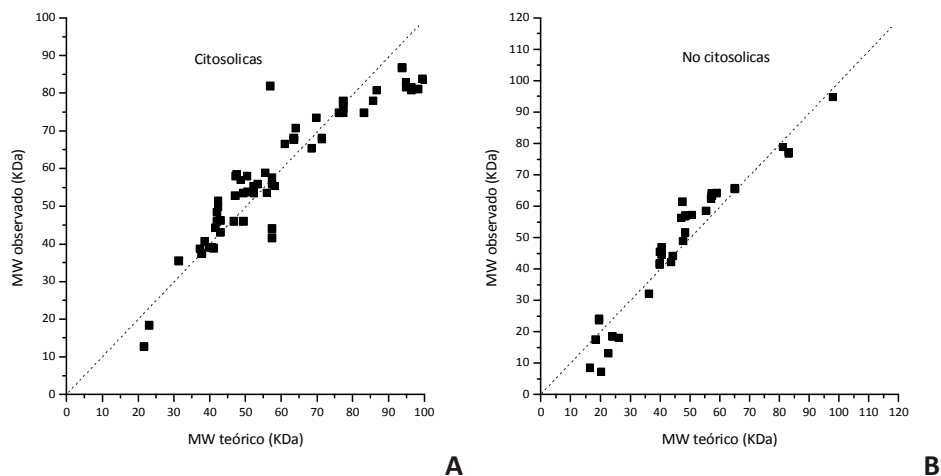


Figura 3.11 Correlación entre los pesos moleculares teóricos y experimentales de las subunidades polipeptídicas

Los valores empleados para la construcción de estas gráficas se encuentran consignados en las Tablas 3.2 (panel A) y 3.3 (panel B).

Identificación de los *spots* presentes en los geles 2D-PAGE.

Luego de lograda la correcta resolución de los péptidos componentes de nuestros extractos proteicos, procedimos a la identificación de los diferentes *spots* consenso mediante la técnica denominada “huella peptídica” (PMF). Brevemente, este procedimiento consiste en la escisión de los *spots* a analizar, su tratamiento con proteasas específicas (en nuestro caso tripsina) y el análisis posterior de los digestos trípticos por medio de espectrometría de masas (MS) y ocasionalmente MS/MS en tándem. Los espectros de masas que así se obtuvieron fueron contrastados con los obtenidos a partir de una digestión virtual de proteínas contenida en una base de datos. En nuestro caso empleamos el software Mascot (Matrix Science Ltd, UK) para realizar la identificación. Dentro del análisis comparativo incluimos además la posibilidad de modificaciones post-traduccionales, ya sean propias de la bacteria o producidas durante el procesamiento de obtención y separación de los extractos proteicos. Por otra parte el análisis de la relación M/Z de los polipéptidos detectados en el digesto tríptico nos permitió proponer la presencia de algunas modificaciones post traduccionales. Hemos utilizado para ello la herramienta informática Findmod, disponible libremente en Internet (www.expasy.ch/tools/findmod/). Cuando estas modificaciones fueron detectadas, las mismas se incorporaron al algoritmo de búsqueda de identidad de proteínas (software MASCOT). Los resultados así obtenidos se incluyeron en la columna *modificaciones* de las Tablas 3.2 y 3.3.

La tolerancia en el valor M/Z para el ion precursor y el ión fragmentado estuvo entre 50 ppm y 0.05 Da, respectivamente. La identificación fue aceptada en el caso en los que el valor del *score* asignado a la proteína excedía al *score* umbral calculado por Mascot asumiendo una probabilidad estadística $p < 0.05$.

Primeramente determinamos la identidad de los *spots* presentes en las fracciones de ambas condiciones. En las Figuras 3.12 y 3.13 se muestra la ubicación en

los geles 2D de los *spots* identificados que son comunes en la intra e intercondición. En las Tablas 3.2 y 3.3 se incluyen los datos de la identificación.

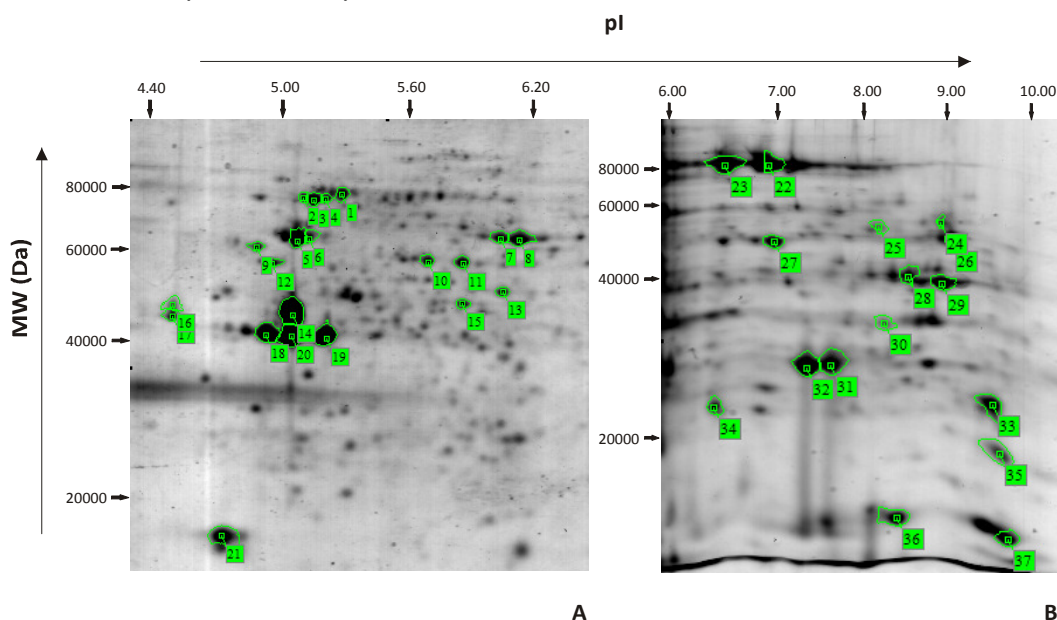


Figura 3.12 Electroforesis en geles 2D PAGE de las fracciones FPS de *B. bronchiseptica* Δ *bvgA*.

La imagen del panel A se obtuvo empleando para la primera dimensión, una tira IPG con un rango de pI de 4 a 7, mientras que para el gel de la imagen B se empleó una tira IPG de rango de pI de 6 a 11. En ambos casos en las tiras de 7 cm de longitud, se sembraron 145 μ g de proteínas. Los geles mostrados son representativos de al menos 6 corridas en 2D PAGE independientes, 3 para cada condición de pH. La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE 12,5 % p/v. La visualización de proteínas se realizó mediante la técnica Coomassie G-250 coloidal.

En la Figura 3.12 se han indicado los *spots* que fueron identificados mediante espectrometría de masa del tipo UV-MALDI-ToF. Los datos referidos a esta identificación están incluidos en la Tabla 3.2

Tabla 3.2 Identidad de los *spots* de FPS de *B. bronchiseptica* señalados en la Figura 3.10

Spot	ORF	Identificación por E.M.					Descripción	MW/pI Teórico	MW/pI Experimental
		Cobertura ¹ (%)	Modificaciones ²	Fragmentación		Valor PMF ³			
				M/Z (Da)	Valor				
1	BB4172	40	C/M			213	Prot. Hipotética	81,3/ 5,24	78,9/5,3
2	BB2613	28	C/M			169	Antígeno superficial	83,2/ 5,19	77,2/5,11
3	BB2613	26	C/M			134	Antígeno superficial	83,2/ 5,19	76,8/5,16
4	BB2613	18	C/M			108	Antígeno superficial	83,2/ 5,19	77,2/5,22
5	BB0962	45	C/M			177	GroEL	57,4/ 5,09	63,4/5,09
6	BB0962	25	C/M	1593,929	72	178	GroEL	57,4/ 5,09	64,1/5,15
7	BB3680	32	C/M			100	Succ. Deshidrog.	65,2/ 6,08	65,8/6,07
8	BB3680	32	C/M			109	Succ. Deshidrog.	65,2/ 6,08	65,4/6,16
9	BB2253	27	C/M	2049,008	110	219	Factor "trigger"	47,6/ 4,95	61,4/4,9
10	BB4607	36	C/M			154	ATP Sint. Sub. A	55,5/ 5,62	58,5/5,72
11	BB3749	23	C/M			149	Serino proteasa	48,6/ 5,98	57/5,62
12	BB4605	43	C/M			133	ATP Sint. Sub. B	50,6/ 4,98	57,3/4,98

Spot	ORF	Identificación por E.M.				Valor PMF ³	Descripción	MW/pi Teórico	MW/pi Experimental
		Cobertura ¹ (%)	Modificaciones ²	Fragmentación					
				M/Z (Da)	Valor				
13	BB4359	30	C/M			99	Supuesto mod. de DNA girase	48,5/ 5.86	51,6/6,09
14	BB3842	51	C/M,ΔNH ₂ ,P	3141,377 1432,766 3319,6 2253,102	223 128 182 77	673	Precursor de Porina	39,9/ 5,15	45,5/5,08
15	BB3838		C/M	1900,924	70	145	NADH Desh. Sub. δ	47,7/ 5.75	48,9/5,9
16	BB2539	36	C/M,ΔNH ₂ ,P	2671,28 2036,037	149 105	274	Flagelina	40,5/ 4.44	46,9/4,53
17	BB2539	36	C/M,ΔNH ₂ ,P	2671,28 2392,125	156 67	256	Flagelina	40,5/ 4.44	44,6/4,53
18	BB3842	32	C/M			102	Precursor de Porina	39,9/ 5,15	41,8/4,96
19	BB3842	32	C/M			109	Precursor de Porina	39,9/ 5,15	41,4/5,24
20	BB3842	51	C/M,DeNH ₂ ,Pho	3141,338 1432,661	157 98	265	Precursor de Porina	39,9/ 5,15	41,6/5,07
21	BB4918	43	C/M	1791,913 2032,157	25 120	165	Bacterioferritina	18,4/ 4.75	17,5/4,78
22	BB1844	24	C/M			120	Aconitato hidratasa	98/ 7.23	94,8/7,13
23	BB1844	24	C/M			120	Aconitato hidratasa	98/ 7.23	94,8/6,72
24	BB0111	19	C/M	1496,708	22	88.5	Posible deshidrogenasa	59/ 8.57	64,2/9,1
25	BB3060	21	C/M			91	Posible glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	57,2/ 8.38	62,4/8,39
26	BB3736	17	C/M	1415,825	29	88	Amino peptidasa citosólica	48,5/ 9.04	56,8/9,21
27	BB3231	44	C/M			144	Factor Rho	47,2/ 7.19	56,3/7,2
28	BB3686	15	C/M	1541,771 1692,771	97 32	189	Metil-Citrato sintasa	44,3/ 8.71	44,2/8,73
29	BB4237	51	C/M			296	Proteína de translocación TolB	43,7/ 9,22	42,2/9,11
30	BB3036	30	C/M			90	Muramoil-tetrapéptido carboxipeptidasa	36,3/ 8.37	32,2/8,45
31	BB3474	26	C/M	2433,273	119	148	Proteína de memb. Ext. A	19,5/ 7,97	24,2/7,84
32	BB3474	26	C/M	2433,273	119	148	Proteína de memb. Ext. A	19,5/ 7,97	23,7/7,57
33	BB0011	31	C/M	1432,751	61	113	Prot. ribosomal L1	24/ 9.69	18,5/9,69
34	BB2029	33	C/M			104	Posible sub. de unión a ATP de sist. de transp. tipo ABC	26,1/ 6,77	18,1/6,62
35	BB0030	57	C/M			159	Proteína ribosomal L4	22,7/ 9,9	13,2/9,77
36	BB1917	43	C/M			110	Proteína ribosomal L9	16,4/ 8,92	8,5/8,6
37	BB0043	51	C/M			82	Proteína ribosomal L5	20,3/ 9,69	7,3/9,87

1 Porcentaje del total de la secuencia aminoacídica teórica de la proteína cubierta por los péptidos detectados en el espectro de masas.

2 Modificaciones fijas (valor izquierdo) ó a al azar (valor derecho) tenidas en cuenta durante la identificación. C= Carbamidometilación de cisteínas; M= Oxidación de metioninas; ΔNH₂= desaminación; P= fosforilación de serinas, treoninas o tirosinas.

3 Valor nominal asignado por el software MASCOT®. Valores superiores a 83 poseen una significación estadística con un $\alpha > 0,05$. En caso de haber sido realizado, se consigna el valor aportado por la fragmentación de un péptido a la izquierda de esta columna.

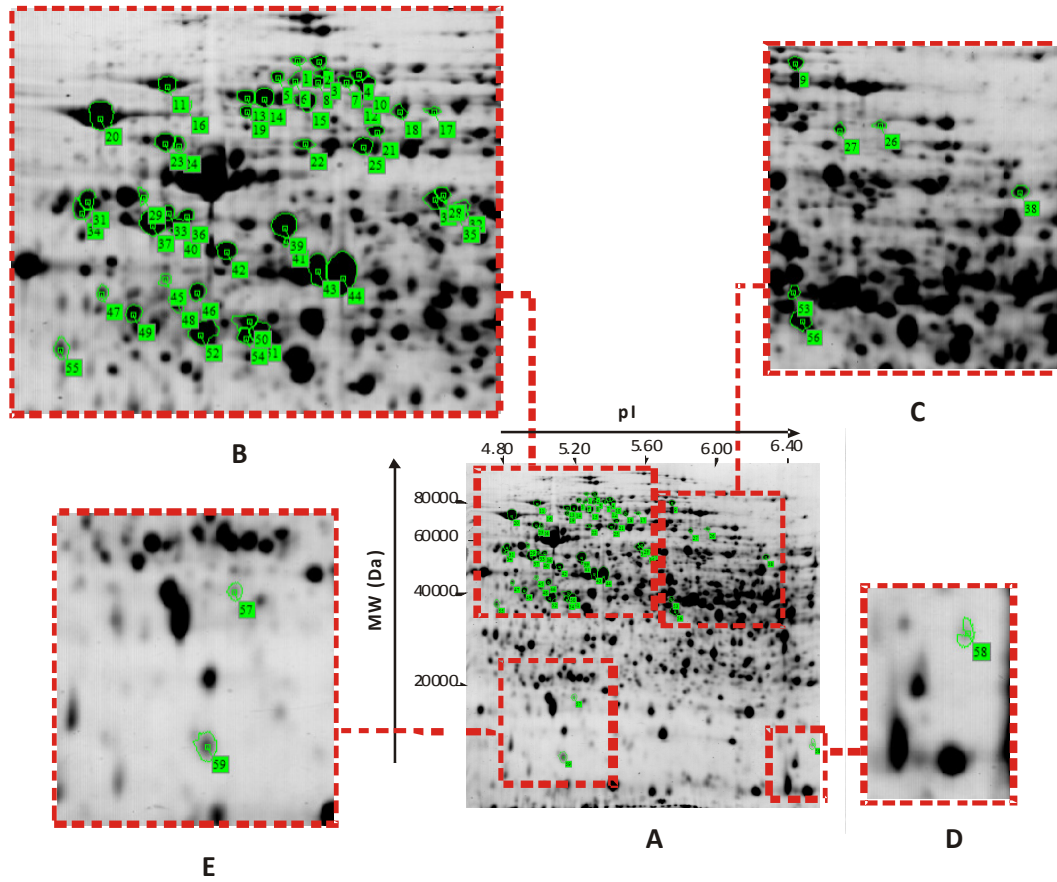


Figura 3.13. Geles 2-DE representativos de FPC de la cepa de *B. bronchiseptica* $\Delta bvgA$.

La imagen A corresponde a lo observado empleando en el IEF, una tira IPG con rango de pI de 4 a 7. Las imágenes B, C, D y E corresponden a ampliaciones de la imagen A realizadas con el fin de facilitar la visualización de las regiones analizadas en el gel. La longitud de la tira empleada en el IEF fue de 18 cm. La cantidad de proteínas sembrada fue 400 μ g. La imagen mostrada es representativa de lo observado en ocho geles independientes, cuatro de ellos provenientes de cultivos adaptados y los otros cuatro a cultivos sin adaptar. La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE 12,5 % p/v. La visualización de proteínas se realizó mediante la técnica Coomassie G-250 coloidal.

La identificación de los *spots* indicados en la Figura 3.10 se realizó mediante espectrometría de masa del tipo UV-MALDI-ToF. Los datos de la identificación se detallan en la Tabla 3.3

Tabla 3.3. Identidad de los *spots* de FPC de *B. bronchiseptica* señalados en la figura 3.11.

Spot	ORF	Identificación por E.M.					Descripción	MW/pI Teórico	MW/pI Experimental
		Cobertura ¹ (%)	Modificaciones ²	Fragmentación		Valor PMF ³			
				M/Z (Da)	Valor				
1	BB1850	51	C/M	1618,9324	106	270	Aconitato hidratasa	93,8/5,27	86,9/5,27
2	BB1850	52	C/M	3209,1207 1618,9151	30 101	282	Aconitato hidratasa	93,8/5,27	86,7/5,32
3	BB3239	42	C/M	1818,0282	88	184	ADN pol I	99,5/5,28	83,9/5,33

Spot	ORF	Identificación por E.M.					Descripción	MW/pi Teórico	MW/pi Experimental
		Cobertura ¹ (%)	Modificaciones ²	Fragmentación		Valor PMF ³			
				M/Z (Da)	Valor				
4	BB1930	52	C/M	1989,8193	170	391	Aminopeptidasa N	100,1/5,37	83,6/5,4
5	BB3687	45	C/M	2077,0532 2030,0823	126 82	351	Aconitato hidratasa	94,9/5,24	82,9/5,23
6	BB2537	40	C/M	2316,2454 1414,758 1527,7798	39 59 100	279	Dihidrolipoamida acetiltransferasa	56,9/5,54	81,9/5,27
7	BB3293	55	C/M	2262,201	121	306	Proteasa ATP-dependiente, sub ATPasa	96,4/5,37	81,6/5,37
8	BB3687	55	C/M	2077,317 1501,9284	130 46	385	Aconitato hidratasa	94,9/5,24	81,6/5,31
9	BB3932	53	C/M	2678,3691	214	435	Probable Zinc proteasa	98,3/5,71	81,1/5,75
10	BB3293	53	C/M	1907,9134 2262,1077	138 155	486	Proteasa ATP-dependiente, sub ATPasa	96,4/5,37	80,7/5,42
11	BB2622	45	C/M	2033,0885	144	277	Fosfoenolpiruvato sintasa	86,7/5,02	80,7/5
12	BB1248	47	C/M	2059,904 1977,9562	167 90	424	Proteasa ATP-dependiente La	85,7/5,38	78/5,4
13	BB0026	59	C/M	2068,2793 2097,1852 1764,0685	117 97 86	424	Factor de elongación G	77,3/5,15	78/5,16
14	BB0026	59	C/M	2068,262 1782,0332	130 120	504	Factor de elongación G	77,3/5,15	77,8/5,2
15	BB3881	46	C/M	1957,2775 2176,3952	83 146	339	Poliribonucleótido nucleotidiltransferasa	77,4/5,28	76,9/5,29
16	BB0026	31	C/M	2096,957	95	170	Factor de elongación G	77,3/5,15	76/5,04
17	BB4090	56	C/M	1939,9757 1902,8554	78 120	326	Glicil-tRNA sintetasa, cad. Beta	76,1/5,51	74,8/5,56
18	BB3881	36	C/M	2052,9733 1957,0529 2176,1526	30 55 78	244	Poliribonucleótido nucleotidiltransferasa	77,4/5,28	74,8/5,49
19	BB2613	61	C/M	2637,6249 1857,0603 1990,26	110 76 84	455	Probable antígeno superficial	83,2/5,19	74,8/5,16
20	BB3934	49	C/M	2354,3759 1566,8963	243 120	540	Chaperona DnaK	69,8/4,88	73,5/4,85
21	BB4232	50	C/M	1933,0099	125	256	prolil-tRNA sintetasa	64/5,4	70,7/5,44
22	BB4924	60	C/M	2043,9018 1866,9333	154 125	482	2-isopropilalato sintasa	63,5/5,36	68,2/5,29
23	BB0501	57	C/M	2029,1826 1927,0269	160 69	380	HSP 90	71,3/5,01	68,2/5
24	BB0501	29	C/M	2029,0133	76	145	HSP 90	71,3/5,01	67,8/5,02
25	BB4924	66	C/M	2044,0396	172	365	2-isopropilalato sintasa	63,5/5,36	67,6/5,41
26	BB4323	37	C/M	1810,9842 2073,1223	108 33	191	Ureasa, sub. Alfa	61/5,74	66,6/5,94

Spot	ORF	Identificación por E.M.				Valor PMF ³	Descripción	MW/pi Teórico	MW/pi Experimental
		Cobertura ¹ (%)	Modificaciones ²	Fragmentación					
				M/Z (Da)	Valor				
27	BB2434	56	C/M	1642,6923 1911,0385	67 94	340	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	68,5/5,66	65,4/5,85
28	BB4626	58	C/M	3415,758 1974,9137	113 49	390	Antranilato sintasa, componente I	55,5/5,47	58,9/5,58
29	BB2253	52	C/M	2048,9883 1335,6184	92 72	240	factor "trigger"	47,6/4,95	58,5/4,94
30	BB0876	34	C/M	2869,4004 1593,6839 1624,8706	108 79 57	328	Proteína de bios. de polisacáridos	50,5/5,9	58/5,56
30	BB2925	44	C/M	1593,6839	79	133	Proteína de bios. de polisacárido capsular	47,3/5,58	58/5,56
31	BB0962	32	C/M	1880,8577 1794,0259	104 35	247	Chaperona GroEL	57,4/5,09	57,6/4,82
32	BB3749	53	C/M	1435,656 1900,8954 2007,1183	54 44 66	207	Serino proteasa	48,6/5,98	57/5,62
33	BB2313	48	C/M	1334,8158 2773,656 166,3023	95 185 91	472	Posible peptidasa	53,4/4,99	55,8/5
34	BB0962	69	C/M	1880,8289	113	225	Chaperona GroEL	57,4/5,09	55,8/4,81
35	BB2327	72	C/M	1803,0256 1913,9835 2323,266	85 59 80	423	Proteína bifuncional GMP sint./glutamina amidotransferasa	58,1/5,54	55,3/5,61
36	BB4532	57	C/M	2157,152 2087,0886	175 164	517	Aspartil/glutamil-tRNA aminotransferasa, sub. B	52,3/5,03	55,3/5,04
37	BB4605	45	C/M	1414,6878	96	268	ATP sintasa sub. B	50,6/4,98	53,8/4,97
38	BB1884	51	C/M	2249,1632 1440,6923 2868,3854	101 72 177	447	Posible proteína de transp. unidora de solutos	56/6,4	53,6/6,27
39	BB1806	8	C/M	1970,138	165	257	Succinato-semialdehído dehidrogenasa	52,4/5,21	53,5/5,24
40	BB1986	54	C/M	2051,2539	123	211	Argininosuccinato sintasa	49,4/5,21	53,5/5,24
41	BB4854	59	C/M	1851,0895 2140,2446	91 183	273	Histidinol dehidrogenasa	47,1/4,98	52,8/5,02
42	BB0195	53	C/M	2273,1499 1533,7126	34 43	166	S-adenosilmetionina sintetasa	42,3/5,12	51,4/5,25
43	BB0195	59	C/M	1533,7792	145	253	S-adenosilmetionina sintetasa	42,3/5,12	49,9/5,12
44	BB3668	33	C/M	1946,0262 2007,0216	29 82	194	Dihidrolipoamida acetiltransferasa	42/5,36	46/5,31

Spot	ORF	Identificación por E.M.					Descripción	MW/pi Teórico	MW/pi Experimental
		Cobertura ¹ (%)	Modificaciones ²	Fragmentación		Valor PMF ³			
				M/Z (Da)	Valor				
45	BB3469	68	C/M	2424,2505	22	86	3-Fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa	46,8/5,34	46/5,31
46	BB0007	31	C/M	2009,952 1681,8655	143 164	395	Factor de elongación Tu	43/5,34	46,2/5,37
47	BB1986	63	C/M	2051,0355 1895,9812	65 12	134	Argininosuccinato sintasa	49,4/5,21	46/5
48	BB4193	48	C/M	2846,7859 1906,0965	166 76	349	Proteína de división celular FtsZ	41,6/5,01	44,3/5,06
49	BB0962	41	C/M	1880,8382 1896,8299	62 61	145	Chaperona GroEL	57,4/5,09	44,1/4,85
50	BB0007	54	C/M	2010,2141 1682,0887	134 120	374	Factor de elongación Tu	43/5,34	43,1/5,02
51	BB0962	44	C/M	1880,8836 1896,8864	121 91	249	Chaperona GroEL	57,4/5,09	41,6/4,92
52	BB2132	53	C/M	2329,4536 1428,9005	98 72	243	3-isopropilmalato dehidrogenasa	38,6/5,21	40,7/5,17
53	BB2133	34	C/M	1701,9897 2349,5047	135 94	347	Aspartato-semialdehido dehidrogenasa	40,5/5,17	39,1/5,19
54	BB3842	55	C/M	2253,2677	131	175	Precursor de porina de memb externa	39,9/5,15	39,1/5,07
55	BB4103	55	C/M	1792,8926	43	125	Proteína hipotética BB4103	41,1/5,77	38,9/5,74
56	BB0274	48	C/M	1909,1246 2100,1651	165 176	379	Proteína hipotética BB0274	37,3/5,08	38,7/5,16
57	BB2478	50	C/M	2179,9686	61	158	Proteína hipotética BB2478	37,8/4,78	37,4/4,76
58	BB0185	44	C/M	1959,9269 1425,7702	141 79	334	Posible proteína periplásmica unidora de solutos	31,3/5,56	35,5/5,76
59	BB2534	51	C/M	2716,3209 1836,9117	134 69	263	Componente regulador de sistema de dos componentes	23,1/5,3	18,4/5,2
60	BB3594	52	C/M	2036,9011 2052,9032	69 82	112	Proteína hipotética BB3594	21,6/6,59	12,8/6,53
61	BB3668	42	C/M	1946,0364 2007,0373	37 113	224	Dihidrolipoamida acetiltransferasa	42/5,36	48,4/5,32

¹ Porcentaje del total de la secuencia aminoacídica teórica de la proteína cubierto por los péptidos observados en el espectro de masas.

² modificaciones fijas (valor izquierdo) ó a al azar (valor derecho) tenidas en cuenta durante la identificación. C=Carbamidometilación de cisteínas; M= Oxidación de metioninas; ΔNH2= desaminación; P= fosforilación de serinas, treoninas o tirosinas.

³: valor nominal asignado por el software MASCOT®. Valores superiores a 83 poseen una significación estadística con un $\alpha > 0,05$. En caso de haber sido realizado, se consigna el valor aportado por la fragmentación de un péptido a la izquierda de esta columna.

Como puede observarse en las Figuras y Tablas anteriores, varios *spots* de diferente localización correspondieron a la misma proteína. A excepción de la proteína BB3842 y BB2539, estos *spots* de igual identidad en su mayoría difieren en su punto isoeléctrico y en menor medida en su tamaño molecular. Estas diferencias pueden deberse entre otros, a modificaciones post-traduccionales y/o a carbamylaciones generadas a partir de la urea durante el procesamiento de las muestras. La identidad de las proteínas resueltas nos permitió extraer además algunas conclusiones respecto a la efectividad y rendimiento de nuestra estrategia de fraccionamiento subcelular y resuspensión de muestras. Pudimos observar que la proporción de volúmenes de *spots* correspondiente a una determinada localización se correspondía perfectamente con la

localización de la fracción analizada. Esto es, las fracciones FPC contarían con un amplio predominio de proteínas citosólicas (aproximadamente 90% de la cantidad de proteínas identificadas) mientras que las FPS poseen una mayoría de proteínas no citosólicas en su composición (cerca del 74% de la variable volumen total son proteínas no citosólicas). Estas proporciones se mantuvieron independientemente de la condición de cultivo estudiada.

En los que respecta a la solubilización de las proteínas hemos estimado el grado de hidrofobicidad de las proteínas contenidas en cada fracción, a partir de la identidad de los *spots* que las componen. Siguiendo los criterios enunciados por Kyte y Doolittle [226] hemos asignado a cada aminoácido un valor hidrofobicidad. La sumatoria de los valores correspondientes para la totalidad de la secuencia aminoacídica de cada proteína individual dividido por el número de aminoácidos constituye el denominado “gran promedio de hidrofobicidad” o GRAVY. La magnitud de este valor es indirectamente proporcional a la solubilidad en solventes hidrofílicos, es decir, aquellas proteínas con valores GRAVY elevados serán poco solubles en este tipo de solventes y viceversa. Mediante el programa ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) hemos determinado el correspondiente valor para las proteínas identificadas en las FPS, señaladas en la Figura 3.12. Los resultados muestran que los valores de GRAVY alcanzados en las proteínas que forman parte de estos extractos son negativos o cercanos a cero. Estos valores son comparables a los observados por otros autores en extractos enriquecidos en proteínas de membrana externa [223]. La ausencia de proteínas con valores fuertemente positivos, como varios ejemplos de proteínas integrales de membrana interna, pone en evidencia algunas limitaciones de la metodología ensayada. No obstante esto no invalida los análisis comparativos para las proteínas detectadas, dado que las muestras provenientes de ambas condiciones de incubación bacteriana observan resultados de hidrofobicidad comparables.

Análisis cuantitativo de expresión diferencial protéica para ambas condiciones de incubación

Habiendo validado nuestra estrategia de enriquecimiento diferencial y resolución de extractos proteicos, procedimos entonces a la caracterización molecular de las diferencias de expresión asociadas con la acidificación del medio durante el proceso de adaptación. Analizamos tanto la presencia y ausencia de *spots* como también las diferencias cuantitativas entre las dos condiciones de cultivo estudiadas. En términos prácticos, diremos que existe una diferencia absoluta de expresión para una cadena polipeptídica en un grupo de geles, cuando un determinado *spot* se encuentra presente en todos los geles dentro de una condición y ausente en la totalidad de los geles pertenecientes a la otra condición. Descartamos en todos los casos aquellos *spots* presentes en algunos geles pero no en otros. Por otra parte, denominaremos diferencias relativas a las observadas en aquellas proteínas expresadas en ambas condiciones pero en niveles significativamente diferentes. Para los análisis cuantitativos hemos incluido 51 *spots* de los 79 que forman parte de los geles consenso del grupo FPS de pl entre 4 y 7; 93 de los 156 de los geles consenso del grupo FPS de pl entre 6 y 11; y 470 de los 620 *spots* contenidos en el gel consenso del grupo FPC, por cumplir los requisitos necesarios para los análisis.

Establecer diferencias relativas de expresión implica necesariamente el empleo de criterios de significación estadística. En nuestro caso para ello utilizamos pruebas paramétricas univariadas del tipo del test T de Student, por ser estas las más frecuentemente utilizadas para este tipo de análisis [227-228]. Este tipo de pruebas requieren, en primer lugar, de una distribución “normal” o “paramétrica” de las variables bajo estudio. Debimos por tanto establecer una variable asociada a la abundancia de cada proteína individual en los extractos que tuviese un comportamiento “normal” en sus distribuciones. Una variable frecuentemente empleada es la variable denominada “volumen del spot”. El volumen del spot se obtiene mediante el producto de la intensidad de tinción máxima del *spot* por una fracción de su área. Esta variable cuantitativa por si misma no se distribuye de forma paramétrica sino que requiere de una transformación logarítmica de la variable volumen original para lograrlo[229]. Otro ajuste realizado para minimizar diferencias entre geles originadas por posibles diferencias de tinción o en un menor ingreso de extracto proteico, consistió en una normalización en función del valor de la sumatoria de variables corregidas en cada gel. El valor de las variables volumen para cada una de los *spots* de los geles 2D-SDS PAGE individuales fue obtenido con el programa Image Master versión 6.0 Platinum® (GE-Healthcare). Como se detalla en la sección Materiales y Métodos, este programa asigna a cada *spot* un volumen en base a la intensidad máxima del *spot* por una fracción de su área.

A continuación hemos analizado el tipo de distribución de la variable volumen, representando la frecuencia observada para cada uno de los valores de esta variable en los geles.

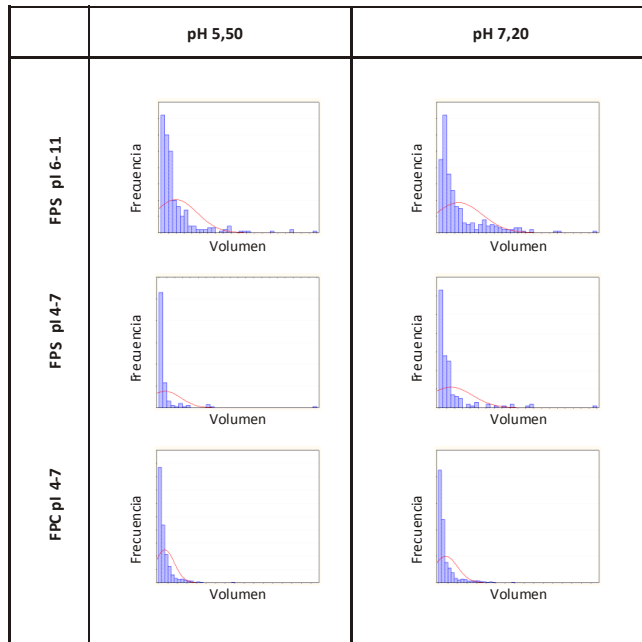


Figura 3.14. Distribución de frecuencias de los volúmenes relativos de los spots de los geles 2D-PAGE extractos citosólicos y de superficie de *B. bronchiseptica*.

En la figura se encuentran representadas de manera conjunta las distribuciones de frecuencia de los valores de la variable volumen relativo porcentual para todos los geles de cada tipo de extracto y condición. En rojo se encuentra representada la distribución continua esperable en el caso de cumplirse un comportamiento normal de los valores experimentales.

En Figura 3. 14 se representan los resultados obtenidos del análisis de las imágenes obtenidas a partir de la digitalización de los geles 2D-PAGE para los distintos tipos de extractos y para la totalidad de condiciones de separación electroforética. Como puede apreciarse en dicha Figura, los diagramas de distribución de frecuencias experimentales en la totalidad de representaciones de la variable *volumen*, no siguen una distribución normal pero si lo hace los valores logarítmicos de esta variable como puede observarse en la Figura 3.15.

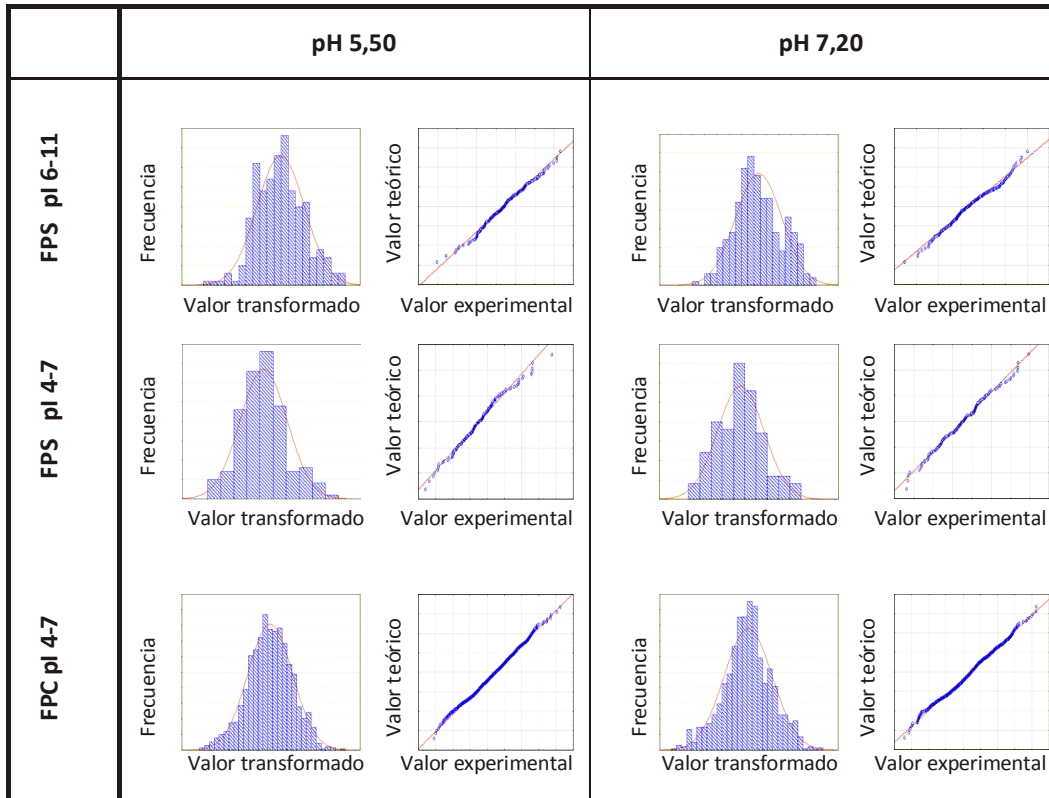


Figura 3.15. Distribución de frecuencias de los volúmenes relativos transformados (valores logarítmicos).

Al igual que en la figura 3.14, se encuentran representadas de manera conjunta las distribuciones de frecuencia de los valores de la variable volumen relativo porcentual para todos los geles de cada tipo de extracto y condición. En rojo se encuentra representada la distribución continua esperable en el caso de cumplirse un comportamiento normal de los valores experimentales. A la derecha de las gráficas de distribuciones de frecuencia, se encuentran representados sus respectivos gráficos cartesianos en los cuales el valor de las abscisas se corresponde con el valor de la variable transformada experimental (logaritmo del volumen) y en la ordenada el valor esperable en caso de poseer la variable una distribución normal. El color rojo en estos últimos gráficos se corresponde a la regresión lineal obtenida para la relación de estos valores.

La Figura 3.15 muestra claramente que la variable volumen expresada como logaritmo sigue una distribución normal. Más aún, en esta Figura puede observarse un alto grado de correspondencia entre el valor esperable de la variable transformada y los valores obtenidos experimentalmente. A partir de aquí comenzamos los análisis para detectar las diferencias cuantitativas de expresión en los geles provenientes de ambas condiciones de cultivo estudiadas. Para las diferencias relativas de expresión

hemos considerado que podrían poseer un valor biológico cambios que dupliquen el valor de la media observada en una condición de crecimiento respecto a la otra. El grado de significación estadística contemplado en estas diferencias tuvo un $\alpha < 0,05$ y un poder $> 80\%$. De esta manera, hemos observado diferencias cuantitativas de expresión con el pH, tanto absolutas como relativas, en los *spots* que están indicados en los geles consenso de la Figura 3.16.

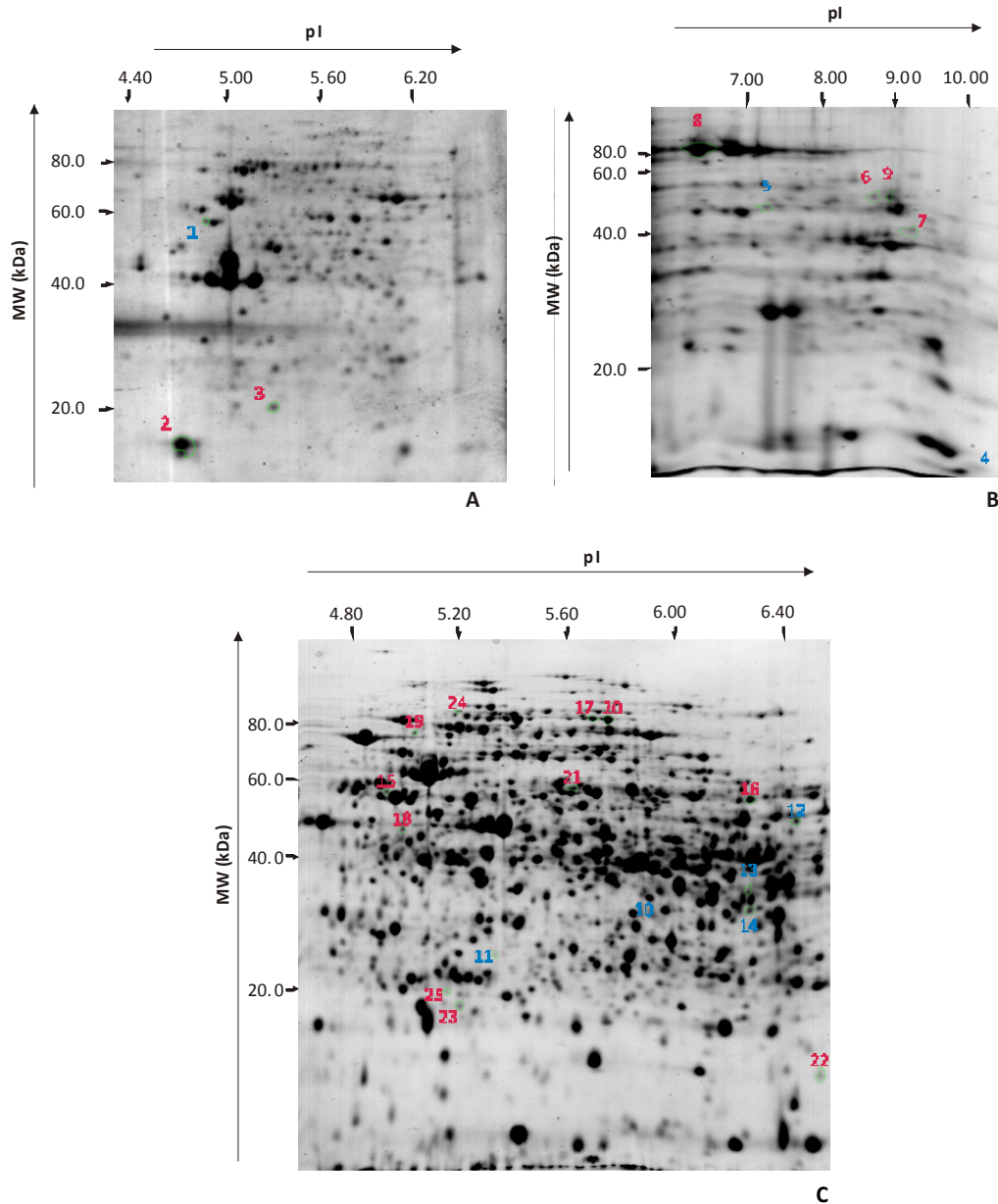





































Figura 3.16. Electroforesis 2D-PAGE de fracciones FPC y FPS de *B. bronchiseptica* bloqueada en fase avirulenta. Comparaciones entre distintas condiciones de cultivo.

En el Panel A están incluidas las imágenes digitalizadas de geles de los grupos FPS obtenidos a partir del empleo de tiras IPG en el IEF con un rango de pH de 4 a 7. En el panel B se encuentra la correspondiente al empleo de tiras IPG de pH: 6 a pH: 11 y en el Panel C se corresponde a las FPC (IEF pH 4-7). Las condiciones de resolución, tinción y análisis empleadas en cada caso se encuentran detalladas en el texto. Los datos en rojo corresponden a *spots* cuya expresión se encuentra significativamente incrementada en la condición de pH: 5, 50 y mientras que los marcados en azul se refieren a los *spots* incrementados en la condición de pH: 7, 20.

Considerando a la totalidad de los grupos, se ha detectado una expresión diferencial en 25 de los 614 *spots* incluidos en el análisis. Tres de estos 25 fueron detectados en geles correspondientes al grupo FPS de pI 4-7, seis en el grupo FPS de pI 6 a 11 y los 16 *spots* diferenciales restantes pertenecen al grupo FPC (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Diferencias de expresión proteica con valor biológico y significación estadística

Muestra/ IEF	ID	pH cultivo	Vol (Media [C.I. P>0,95])	Imágen	V5,5/V7,2	Proteína
Membrana / 4-7	1	pH: 5,50	5500 [6400-4700]		0.44	N.I.
		pH: 7,20	12000 [15000-11000]			
Membrana / 4-7	2	pH: 5,50	190000 [260000-140000]		3.9	Bacterioferritina
		pH: 7,20	50000 [98000-25000]			
Membrana / 4-7	3	pH: 5,50	11000 [15000-7500]		-	N.I.
		pH: 7,20	-			
Membrana / 6-11	4	pH: 5,50	-		-	N.I.
		pH: 7,20	43000 [56000-33000]			
Membrana / 6-11	5	pH: 5,50	4500 [6100-3400]		0.35	N.I.
		pH: 7,20	13000 [15000-11000]			
Membrana / 6-11	6	pH: 5,50	9900 [14000-6700]		2.7	N.I.
		pH: 7,20	3700 [4500-3000]			
Membrana / 6-11	7	pH: 5,50	8100 [12000-5500]		3.0	N.I.
		pH: 7,20	2700 [3700-2000]			
Membrana / 6-11	8	pH: 5,50	87000 [140000-56000]		4.5	Aconitasa A
		pH: 7,20	20000 [33000-11000]			

Membrana / 6-11	9	pH: 5,50	34000 [70000-17000]		11.0	Posible Deshidrogenasa
		pH: 7,20	3200 [4600-2200]			
Citosólica / 4-7	10	pH: 5,50	-		-	N.I.
		pH: 7,20	30000 [32000-28000]			
Citosólica / 4-7	11	pH: 5,50	2300 [2900-1900]		0.19	N.I.
		pH: 7,20	12000 [16000-9000]			
Citosólica / 4-7	12	pH: 5,50	22000 [24000-20000]		0.38	N.I.
		pH: 7,20	59000 [71000-48000]			
Citosólica / 4-7	13	pH: 5,50	17000 [20000-14000]		0.43	N.I.
		pH: 7,20	39000 [51000-30000]			
Citosólica / 4-7	14	pH: 5,50	24000 [25000-22000]		0.49	N.I.
		pH: 7,20	49000 [62000-38000]			
Citosólica / 4-7	15	pH: 5,50	11000 [13000-10000]		2.0	N.I.
		pH: 7,20	5500 [7400-4100]			
Citosólica / 4-7	16	pH: 5,50	45000 [58000-35000]		2.1	Transporte de solutos
		pH: 7,20	22000 [27000-17000]			
Citosólica / 4-7	17	pH: 5,50	32000 [38000-28000]		2.2	N.I.
		pH: 7,20	15000 [22000-10000]			
Citosólica / 4-7	18	pH: 5,50	13000 [14000-12000]		2.6	Arg-Succ sintasa

		pH: 7,20	5200 [6000-4500]			
Citosólica / 4-7	19	pH: 5,50	9100 [12700-6500]		2.8	Factor de elongación G
		pH: 7,20	3300 [5400-2000]			
Citosólica / 4-7	20	pH: 5,50	84000 [87000-82000]		5.2	Zn proteasa
		pH: 7,20	16000 [27000-9700]			
Citosólica / 4-7	21	pH: 5,50	20000 [27000-15000]		-	Serino proteasa
		pH: 7,20	-			
Citosólica / 4-7	22	pH: 5,50	18000 [28000-12000]		-	Proteína hipotética
		pH: 7,20	-			
Citosólica / 4-7	23	pH: 5,50	12000 [19000-7900]		-	Sist. dos Componentes
		pH: 7,20	-			
Citosólica / 4-7	24	pH: 5,50	8300 [11000-6000]		-	N.I.
		pH: 7,20	-			
Citosólica / 4-7	25	pH: 5,50	8100 [9600-6800]		-	N.I.
		pH: 7,20	-			

De acuerdo con lo detallado en la Tabla 3.4, durante el análisis cuantitativo de las FPC se observaron diferencias de expresión en 16 *spots* de los 470 analizados. Estas diferencias abarcaron por un lado, cambios absolutos en la expresión de 6 subunidades peptídicas: 1 exclusiva de pH: 7,20 y 5 propias de la condición pH: 5,50. Por otro lado, incluyeron cambios en el nivel de expresión de 10 subunidades peptídicas: 4 con niveles mayores en la condición a pH: 7,20 y 6 con niveles mayores en la condición a pH: 5,50.

En relación a las FPS, se analizaron un total de 144 *spots*, 51 de ellos con valores de pIs en el rango 4 a 7 y 93 en el rango de pI 6 a 11. En la Tabla 3.4 se incluyen los 9 *spots* detectados con expresión diferencial entre las condiciones de pH ensayadas.

Estas diferencias abarcaron por un lado, cambios absolutos en la expresión de 2 subunidades peptídicas: 1 exclusiva de cada condición de pH. Por otro lado, incluyeron cambios en el nivel de expresión de 7 subunidades peptídicas: 2 incrementadas en la condición de pH: 7,20 y 5 en la condición de pH: 5,50.

En resumen, nuestro análisis proteómico comparativo ha permitido detectar diferencias de expresión en aproximadamente el 4% de los polipeptidos detectables en una y otra condición de pH. Estos incluyen 17 subunidades polipepticas cuya expresión estaba incrementada y 6 de expresión disminuida para extractos provenientes de cultivos ácidos (pH: 5,50) respecto a los provenientes de cultivos neutros (pH: 7,20). Este predominio en la inducción de proteínas a expensas de la acidez es comparable con lo observado como consecuencia del proceso de adaptación a la acidez en otros patógenos bacterianos como *S. typhimurium* y *Listeria monocytogenes* [206, 230].

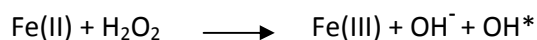
Función biológica de las proteínas identificadas como diferenciables en las condiciones de cultivo estudiadas

A continuación se describen brevemente algunas características de las proteínas detectadas como diferenciales entre condiciones:

BB4918, Bacterioferritina (Bfr)

El hierro en exceso, tanto en su forma ferrosa como férrica, tiene efectos tóxicos sobre los microorganismos [231-233]. Varias especies bacterianas presentan como mecanismo de defensa frente a los efectos deletéreos del hierro la síntesis de un grupo de proteínas denominadas Bacterioferritinas (Bfr) [231, 233-236]. Estas proteínas suelen ser clasificadas dentro del grupo de las proteínas Ferritinas que contienen el grupo prostético hemo b [231]. El principal rol de estas proteínas es el almacenamiento de hierro y/o protección a stress oxidativo [231, 234-235]. En el caso de *B. bronchiseptica* se ha detectado en la secuencia genómica una única copia de Bfr, localizada en el ORF BB4918 [98]. El peso teórico estimado para esta proteína es de 18,4 KDa que por comparación con otros microorganismos sería la responsable de formar los complejos de subunidades característicos de las bacterioferritinas [234-235]. La formación de estos complejos supramoleculares es asociado a alta inmunogeneicidad de las bacterioferritinas [237-239].

Como hemos mencionado, uno de los principales roles de la Bfr es el de secuestrar el Fe(II) libre intracelularmente, oxidarlo y almacenarlo bajo la forma de compuestos insolubles de Fe(III) en su interior [231, 233, 235]. Este proceso suele ser esencial para las bacterias dado que el Fe(II) libre intracelularmente representa una fuente potencial de daño oxidativo, por su tendencia a generar radicales libres mediante la reacción de Fenton [233]:



Dependiendo del microorganismo, Bfr puede tener un rol fisiológico predominante en el mantenimiento de la homeostasis del hierro ó en la defensa frente a stress oxidativos de variados orígenes [231, 233-235]. Uno de los mediadores más importantes del aumento de expresión de Bfr y otras proteínas a expensas del Fe(II) es la proteína Fur (*Ferric Uptake Regulator*) [233, 240]. Interesantemente, esta última proteína puede desempeñar un importante rol en el desarrollo de ATR [208, 241]. Si bien no hemos analizado este último aspecto, el genoma secuenciado de la cepa de *B.*

bronchiseptica RB50, posee dos ORF para la proteína Fur (BB0215 y BB3942) [98, 191]. Al menos una de estos dos codifica para un producto funcional que responde de manera análoga a cambios en la concentración de hierro con genes equivalentes de otras bacterias Gram negativas [188-191].

Las propiedades inmunogénicas de esta proteína han motivado estudios que la incluyen dentro de diferentes estrategias inmuno-preventivas con resultados hasta ahora muy variables [238, 242-245].

BB1844, Aconitasa A (AcnA)

La enzima Aconitato hidratasa o aconitasa cataliza la transformación reversible de citrato en isocitrato, pasando por el compuesto intermedio cis-aconitato. Esta reacción forma parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Posee como grupo prostético un centro $[4Fe-4S]^{+2}$ [233, 246]. Se conocen dos isoformas bacterianas de la enzima Aconitasa, la AcnA y AcnB [246-247]. La isoforma que ha mostrado encontrarse en nuestro caso inducida por la acidificación del medio, es la AcnA. Esta isoforma tendría un rol homólogo al de la AcnA de eucariotes. En las bacterias la AcnA es una enzima citosólica cuya función más importante es la de funcionar como un sensor de la disponibilidad de Fe(II) intracelular, reprimiendo la traducción de diferentes mRNA en condiciones de baja concentración de éste ión (entre ellos su propio mRNA) [247]. *B. bronchiseptica* posee en su genoma tres secuencias que codifican para la proteína AcnA (BB1844, BB3687 y BB1342) y uno para AcnB (BB1850) [98]. La presencia de esta variedad en proteínas homólogas puede ser un indicio tanto de la complejidad en su regulación como de su importancia. Hemos detectado la presencia de dos de las tres AcnA, BB1844 y BB3687, la primera de ellas en los extractos FPS y la segunda en los FPC. En cuanto a la AcnB, hemos detectado la presencia de esta proteína, en la fracción FPC (Tabla 3.3). De acuerdo a lo observado en nuestros experimentos: BB3687 y BB1850 tendrían los mismos niveles de expresión para las diferentes condiciones de pH ensayadas. Por el contrario, BB1844 pareciera poseer mayores niveles de expresión a pH: 5,50 que a pH: 7,20.

Es interesante volver a remarcar que AcnA es una proteína cuya expresión ha sido relacionada positivamente con la disponibilidad de hierro. Más aún, la proteína Fur es también en este caso uno de los reguladores positivos más importantes del aumento de su expresión [233, 240].

BB3749, Serino proteasa periplasmática (MucD)

El análisis proteómico de expresión diferencial ha permitido detectar a la proteína BB3749 en las fracciones FPS y FPC para el material proveniente de cultivos a pH: 5,50 y solamente en la FPS del proveniente de cultivos de pH: 7,20. En todos los casos esta proteína fue detectada en el rango de pI de 4 a 7. Las cantidades detectadas en las FPS de cultivos de pH: 7,20 fueron mínimas aunque no significativamente inferiores a las detectadas en cultivos realizados a pH: 5,50. La variable volumen en las dos condiciones tuvo un valor de 19000 [31000-12000] y 32000 [45000-23000], respectivamente. En cambio en la fracción FPC se registró una diferencia absoluta en cantidades para esta fracción: la proteína BB3749 fue identificada solamente en los FPC provenientes de cultivos ácidos.

La proteína codificada en el ORF BB3749, DegP o MucD, pertenece a un conjunto de proteínas periplasmáticas con actividad chaperona/serino proteasa, de las

cuales su ejemplo prototípico es HtrA [248]. Estas proteínas poseen dos dominios del tipo PDZ, de interacción proteína-proteína y al menos un dominio serino proteasa, conteniendo un sitio catalítico conformado por los aminoácidos histidina, aspartato y serina [248]. En su forma inactiva, las proteínas forman estructuras homo-triméricas u homo-hexaméricas, exponiendo hacia la periferia sus dominios PDZ, con el sitio catalítico ubicado hacia el interior del complejo. Poseen afinidad por segmentos hidrofóbicos, los cuales suelen ser expuestos en varias proteínas a consecuencia de su desnaturalización. La interacción con este tipo de residuos induce la formación de agregados de los trímeros/hexameros, originando estructuras dodeca a tetracosaméricas [248-250]. Estas estructuras superiores pueden actuar como chaperonas en la renaturalización proteica [250]. Simultáneamente poseen una actividad endopeptidasa, dependiente de la temperatura. Esta actividad conduce en el largo plazo, a un mecanismo auto-inhibitorio postraducciona [249].

El incremento de BB3749 en *B. bronchiseptica* conforme a la acidificación del medio permite pensar en un incremento en la desnaturalización proteica en este compartimento ocasionado por la acidez del medio circundante.

La importancia de la expresión de MucD fue estudiada para la bacteria filogenéticamente cercana *B. pertussis*. En esta especie, la inducción de la síntesis del homólogo de MucD (DegP) tiene profundas consecuencias fenotípicas. Los mutantes deletéreos en *degP* (BP2434) tienen un marcado defecto de crecimiento a 37°C, una pérdida incrementada de proteínas al medio extracelular y defectos en el mecanismo de exportación de importantes proteínas de la membrana externa ó liberadas al medio, como la FemHemAglutinina (FHA) [251]. Este último defecto pareciera estar mediado no tanto por la acción endopeptidasa de BP2434 como por su actividad chaperona en el transporte trans-periplásmico de la proteína desplegada [251]. Esto destaca la importancia del rol que pareciera poseer la proteína MucD en el espacio periplásmico de las *Bordetellas*.

De observarse un efecto deletéreo en *B. bronchiseptica* a consecuencia de la inactivación en la expresión de BB3749 frente a este tipo de *stress* o, en consonancia con *B. pertussis* limitando el crecimiento bacteriano a la temperatura corporal, esto podría derivar en futuras aplicaciones inmunopreventivas. De hecho, el empleo de mutantes termosensibles como vacunas atenuadas ha sido ensayado en *B. bronchiseptica*, originando una de las primeras vacunas de aplicación veterinaria basadas en cepas atenuadas contra el patógeno [80].

BB3932, Zn-proteasa de membrana externa

Al igual que en el caso de BB3749, pese a tratarse de una proteína presuntamente extracitosólica (de acuerdo a Psortb 3.0) la diferencia de expresión se detectó en las fracciones FPC. En la fracción FPC proveniente de los cultivos a pH: 5,50 se detectó que la proteína BB3932 quintuplicó su expresión respecto a la detectada en los cultivos a pH: 7,20. La proteína BB3932 no posee homólogos bacterianos caracterizados. Un análisis basado en homología de secuencia realizado por medio del programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) permite detectar la presencia de dos dominios conservados del tipo PqqL (COG0612). Este tipo de dominios, de acuerdo a sección Conserved Domain Databases de la página web del NCBI [252] confiere a las proteínas una actividad proteasa Zn-dependiente. Finalmente, esta proteína, presenta un péptido señal de exporte y localización final en membrana

externa (Psort 3.0b). El sitio de clivaje de esta señal se encontraría entre los aminoácidos 25 y 26 (SignalP 2.0, probabilidad de corte 0.964). El clivaje de esta señal cambiaría el pI de la proteína desde un valor de proteína entera de pI: 5,98 a un valor de proteína clivada de pI: 5,75. Siendo el pI observado experimental de 5,71, a pesar de haber sido detectada en los FPC, esta proteína podría haber sido originada y liberada a partir de la membrana externa durante el procesamiento de las muestras.

BB0026, Factor de elongación G (EF-G)

Asociado al mencionado incremento en la síntesis de proteasas (BB3749 y BB3932), se observa un incremento en la síntesis de una proteína participante en la síntesis proteica *de novo*, el Factor de elongación G (EF-G) [253]. Este factor media la translocación del ribosoma a lo largo del mRNA durante la etapa de elongación en la traducción y síntesis proteica. En los extractos enriquecidos en proteínas citoplasmáticas de cultivos crecidos en medio de pH 5,50 hemos detectado la casi triplicación de la cantidad de EF-G, respecto de los provenientes de cultivos de medio neutro (9100 [12700-6500] y 3300 [5400-2000], respectivamente). Esto podría ser el reflejo de un incremento en la síntesis de proteínas con la acidificación del medio, posiblemente destinado al recambio de aquellas inactivadas por la condición de stress medioambiental.

BB1986, Arginino-succinato sintasa (ArgG)

El *spot* correspondiente a esta proteína ha sido detectado en las FPC, viéndose incrementada su expresión en 2,6 veces en el cultivo de pH: 5,50 respecto a la del cultivo a pH: 7,20. La enzima arginino-succinato sintasa cataliza la formación en dos etapas sucesivas del compuesto arginino-succinato empleando como sustratos citrulina, ATP y aspartato. La reacción anterior forma parte del denominado ciclo de la urea, según se señala en la siguiente Figura:

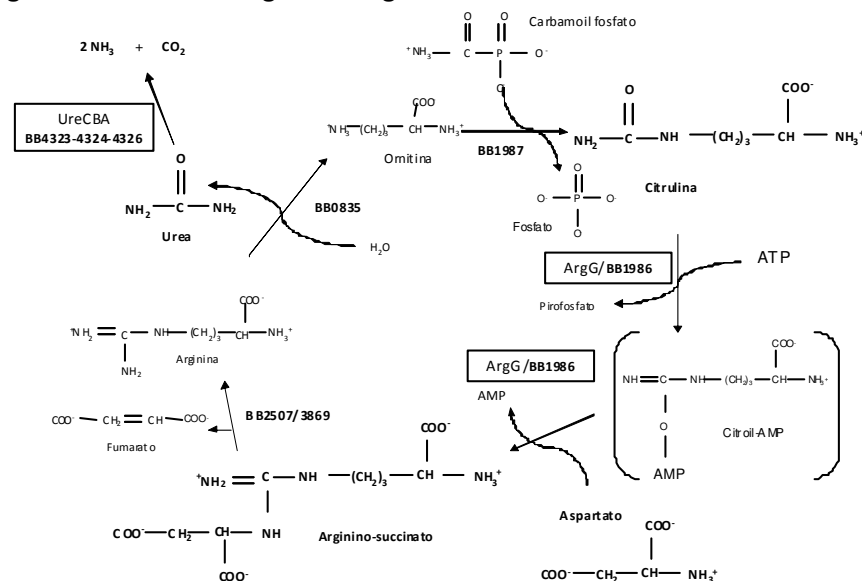
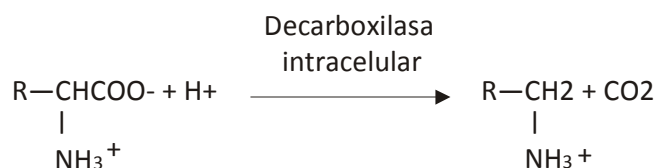


Figura 3.17 Arginino-succinato sintasa y el ciclo de la urea.

En esta Figura se encuentra representado esquemáticamente el ciclo de la urea, habiéndose adicionado a este un paso externo catalizado por la enzima ureasa. Se encuentran señaladas además de ArgG, el resto de las enzimas del ciclo de la urea cuyos ORF se encuentran presentes en el genoma anotado de la cepa de *B. bronchiseptica* RB50.

El ciclo anterior forma parte de una importante vía de eliminación de grupos amino en mamíferos. Pese a esto, la existencia de este ciclo como tal y su rol en *B. bronchiseptica* son difíciles de interpretar. No obstante, la reacción catalizada por ArgG podría participar en una ruta anabólica de generación de Arginina, ruta que estaría entonces inducida por la acidez. Resta sin embargo determinar los motivos por los cuales se elevarían los requerimientos celulares de Arginina. Una posible justificación involucra un consumo incrementado de este aminoácido, por ejemplo, por un aumento en el metabolismo de proteínas con un alto contenido de arginina en su estructura primaria con la acidez. Alternativamente, se conoce que uno de los mecanismos más importante para el sostenimiento de la homeostasis de pH intracelular bacteriano, es la decarboxilación de aminoácidos [210]. La actividad de las enzimas decarboxilasas conduce al consumo de protones intracelulares, como se representa en la siguiente reacción [210]:



El rol de la enzima arginina decarboxilasa en bacterias ha sido estudiada por varios autores [214, 219, 254]. Esta enzima tiene una importancia en el desarrollo de ATR logarítmica, la cual depende tanto de la bacteria estudiada [214, 219, 254] como del medio de cultivo en empleado [254]. *B. bronchiseptica* posee en su genoma un ORF con alta homología a la correspondiente Arginina/lisina/ornitina decarboxilasa inducible por ácido de la cepa de *S. typhimurium* LT2 (ORF BB0850; resultados de BLAST entre ambas secuencias: cobertura de secuencia 99%, valor $e=3 \times 10^{-147}$). En *S. typhimurium* esta enzima participa en la inducción de la respuesta ATR. En el caso que el sistema Arginina decarboxilasa tuviera un rol análogo en *B. bronchiseptica*, el mismo conduciría aun incremento en el consumo del aminoácido Arginina a expensas de la actividad incrementada de la correspondiente enzima decarboxilasa. Esto derivaría en la inducción de mecanismos de reposición del aminoácido, en donde se justificaría el incremento observado en la enzima ArgG a pH: 5,50.

Alternativamente, la inducción de la expresión de la enzima ArgG con la acidez podría estar relacionada con un consumo incrementado de urea. Como se muestra en la figura 3.17, hacia el final del ciclo de la urea, la hidrólisis de Arginina catalizada por la enzima Arginasa (ORF BB0835), produce urea. La degradación de este último compuesto por la enzima ureasa (los ORF correspondientes a UreA, B y C son BB4326/4/3), liberándose dos moléculas de amonio y una de dióxido de carbono, con la consecuente alcalinización del medio.

La enzima ureasa, por su parte, ha mostrado desempeñar un importante rol en la sobrevivencia en ambientes ácidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para varios patógenos de mucosas [177-178, 256]. Quizás el caso más estudiado sea el de *H. pylori*, en el cual la enzima se expresa a niveles superiores a los de todas las demás bacterias estudiadas [210]. La actividad ureasa de *H. pylori* resulta esencial para su sobrevivencia tanto en medios de cultivo ácidos como en ensayos de infección [177, 210, 256-258]. A partir de valores de pH inferiores a pH: 6,0 se produce un incremento en la actividad ureasa en células intactas del patógeno. Sin embargo, esto contrasta con la dependencia de la actividad de la enzima ureasa aislada, la cual es máxima en valores cercanos a la neutralidad. Luego el incremento en la actividad ureasa en células intactas con el descenso de pH es algo complejo, y se encuentra mediado por dos eventos simultáneos. En la Figura 3.18 se detalla una representación esquemática de la regulación de la actividad ureasa por la acidez en *H. pylori*.

En primer lugar, un canal de membrana (UreI), permeable a la urea, amoníaco, ión amonio y al dióxido de carbono, incrementa su frecuencia de apertura a medida que desciende el pH [257]. En paralelo, la activación de una quinasa citosólica (HP0244) con el descenso de pH induce la unión de la enzima ureasa con el canal UreI, activándose así la descomposición de la urea a nivel de la membrana interna [255]. Esta activación es crítica para el sostenimiento de la homeostasis en el pH periplasmático y citosólico [255, 258].

Superpuesta a la regulación por el pH de la actividad ureasa en *H. pylori*, existe una regulación ulterior por la accesibilidad a metales divalentes, en particular Ni²⁺ (cofactor metálico de su sitio activo) [259]. La expresión del operón *ureasa* estaría además, al menos en el caso de *H. pylori*, regulada adicionalmente por el efector transcripcional Fur [260]. Esto es interesante dado que, como fue descrito en otro apartado, este último regulador transcripcional se encuentra vinculado con la resistencia a la acidez tanto en ésta como en otras bacterias [208, 241]. En otros

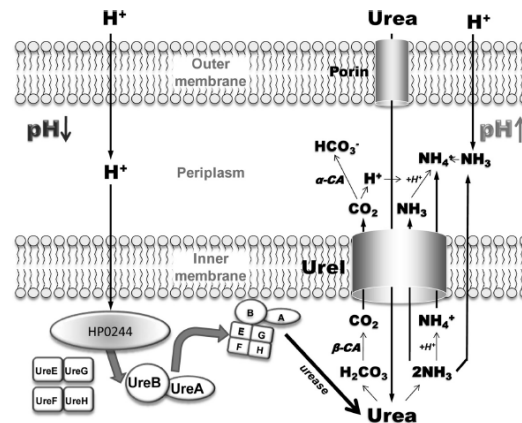


Figura 3.18 Rol de la actividad ureasa en la homeostasis del pH periplásmico en *H. pylori*.

La actividad ureasa permite a éste patógeno neutralófilo no solamente resistir sino duplicarse en condiciones extremas de acidez como las encontradas en el estómago. El mecanismo de inducción de la actividad ureasa en la membrana interna de *H. pylori* ha sido representado en esta figura. Los correspondientes ORF del genoma de *B. bronchiseptica* que codifican proteínas heterólogas se encuentran mencionados en el texto. En este último caso el equivalente del dímero UreBA es el trímero UreCBA. Esquema adaptado de Scott *et al.* [255].

patógenos se han detectado canales similares al mencionado Urel. Recientemente se ha descrito en *Brucella abortus* el transportador UreT, el cual posee una similar activación con el descenso del pH del medio [261].

En el caso de *B. bronchiseptica*, la expresión de actividad ureasa es característica de la fase avirulenta. Existe además una regulación Bvg-independiente con la temperatura, siendo su actividad máxima a 37°C [180]. Ha sido demostrado que la actividad ureasa en esta bacteria posee un rol importante sobre la sobrevivencia bacteriana en ensayos *in vitro* [180]. Sin embargo, al contrario de lo observado en otros patógenos, como *H. pylori* ó *Brucella abortus*, no pareciera desempeñar un rol esencial en ensayos de infección *in vivo* [177-178, 181-182, 256].

La subunidad alfa de la enzima ureasa (UreC, BB4323) ha sido detectada en los FPC, sin mostrar diferencias cuantitativas entre las condiciones de cultivo estudiadas. (Tabla 3.3). La presencia de esta enzima era esperable pues los estudios se realizaron con una cepa bloqueada en el fenotipo avirulento extremo e incluso incubado a 37°C [180]. Resta estudiar en profundidad la función biológica de la enzima ureasa en cuanto a su comportamiento con el pH en células intactas de *B. bronchiseptica*.

BB2534 componente regulador de sistema de dos componentes (TtrR)

BB2534 que se expresa diferencialmente en la condición de crecimiento a pH: 5,50, corresponde al componente regulador de uno de los 16 sistemas de dos componentes presentes en el genoma de *B. bronchiseptica*. No obstante, al menos en nuestro conocimiento, no se ha estudiado aún el rol de este sistema de dos componentes o del presunto catabolismo del tetrionato que pareciera regular. Empleando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), puede verse que la secuencia de este sistema de dos componentes tiene una alta homología con los sistemas TtrRS de varias bacterias gram negativas.

Su estudio en otras bacterias como *S. typhimurium*, ha recibido mayor atención que en las distintas especies del género *Bordetella*. En *S. typhimurium*, el sistema mencionado forma parte de la isla de patogeneidad 2 (ISP-2), junto a moléculas importantes en el desarrollo de las infecciones sobre sus huéspedes, dentro de los podemos mencionar dos sistemas de secreción tipo III [262].

En *S. typhimurium* el denominado locus *ttr* se encuentra integrado por los genes *ttrA,B,C,R* y *S*. Las proteínas TtrA, TtrB y TtrC representan las tres subunidades constituyentes de la proteína *tetrionato reductasa*. Esta enzima cataliza la reducción oxidativa del aceptor final alternativo de la cadena de transporte de electrones tetrionato, según la siguiente reacción:



TtrA emplea como cofactor al dinucleótido de guanina-molibdopterina y posee un centro [4Fe-4S]. TtrB por su parte posee cuatro centros [4Fe-4S], mientras que TtrC es una proteína integral de membrana con un centro de oxidación de quinoles. El enzima tetrionato reductasa se localiza asociado a la cara externa de la membrana celular interna, ejerciendo su actividad en el periplasma [262].

La expresión de los genes *ttrABC* requiere de la presencia de un sistema de dos componentes TtrRS funcional. TtrS es el componente sensible a la concentración de tetrionato que, en respuesta a concentraciones crecientes de este, activa al componente TtrR. TtrR es la subunidad reguladora, con actividad inductora transcripcional de

los genes *ttrABC*. Es importante señalar que, al menos en el caso de *S. Typhimurium*, estos genes no son transcripcionalmente activos en condiciones de aerobiosis [262].

En cuanto al rol biológico del tetrionato, éste es empleado como aceptor final de la cadena de transporte de electrones tanto por bacterias anaerobias, como por anaerobios facultativos en condiciones de anaerobiosis [263]. Su presencia en la naturaleza está asociada a la oxidación de tiosulfato, con lo cual ambos compuestos sulfurados suelen existir simultáneamente. El tiosulfato por su parte, suele ser encontrado en suelos como producto de la oxidación aerobia de azufre empleado como fertilizante agronómico. También es abundante en lechos marinos, particularmente en interfases aerobias/anaerobias, donde la presencia de oxígeno sea suficientemente elevada como para oxidar compuestos sulfurados a tiosulfato, pero no tanto como para continuar con su oxidación. Finalmente, en sistemas biológicos, el tiosulfato es uno de los metabolitos finales del metabolismo de la cisteína por mamíferos.

En el caso de *S. Typhimurium*, la importancia del sistema tetrionato reductasa durante largo tiempo estuvo reservada a su rol como componente de un medio selectivo para su enriquecimiento e identificación a partir de muestras clínicas. Mutantes deletéreos en este sistema enzimático, pese a formar parte de la ISP-2, no observan defectos en su virulencia sobre el modelo murino de fiebre tifoidea [262, 264]. Por lo tanto y dada su ocurrencia en la naturaleza, existió un consenso general sobre su importancia exclusiva durante el tránsito de esta bacteria en el medioambiente. Sin embargo, un trabajo reciente ofrece una interpretación alternativa [264]. En el ambiente anaerobio del lumen intestinal, la formación de compuestos sulfurados por las bacterias intestinales conlleva a su oxidación y formación de tiosulfato por la mucosa cecal. A consecuencia del proceso infeccioso desencadenado por *S. typhimurium* se produce una inflamación local intestinal con consecuente liberación de intermediarios reactivos de oxígeno por parte de los leucocitos presentes. Éstos últimos intermediarios serían capaces de transformar el tiosulfato presente en las inmediaciones de la mucosa intestinal en tetrionato. El tetrionato así formado otorgaría una ventaja metabólica a *S. typhimurium* sobre el resto de las bacterias anaerobias facultativas, proveyéndole de un aceptor final de la cadena de transporte de electrones. De esta manera *S. typhimurium* poseería una ventaja selectiva de crecimiento sobre otras bacterias presentes en el lumen intestinal, favoreciendo por ejemplo su transmisión por la vía fecal-oral.

En el caso de *B. bronchiseptica*, la cepa secuenciada de *B. bronchiseptica* RB50 contiene en su genoma un locus *ttrBCA* y un locus *ttrSR*. Si bien no poseemos información acerca de la expresión de las proteínas TtrA, B ó C, en nuestro trabajo hemos podido detectar un incremento en TtrR. Resulta sorprendente haber observado este incremento a consecuencia de la acidez del medio en condiciones de aerobiosis. Al menos en el caso de *S. Typhimurium*, en presencia de oxígeno la expresión de actividad tetrionato reductasa es inhibida por el regulador transcripcional FnR u OxyA [262]. En el genoma secuenciado de la cepa de *B. bronchiseptica* de RB50 se encuentra el ORF BB3294, el cual posee una significativa homología de secuencia con FnR, de acuerdo al programa BLAST (94% de cobertura, valor $e=2 \times 10^{-5}$). A pesar de ello, según nuestros experimentos, su presencia no pareciera limitar la expresión de TtrR en las condiciones aerobias de nuestros experimentos. La única información disponible en la literatura respecto a la expresión de los genes de los locus *ttrBCA* y

ttrRS proviene, aunque de manera indirecta, del material suplementario de un trabajo reciente [265]. De acuerdo a lo descrito en el material suplementario de este trabajo ambos locus se expresan preferentemente en fase avirulenta, habiendo sido los genes *ttrC* y *ttrR* considerados por los autores, como bvg-reprimidos.

Este no sería el primer caso de regulación concertada entre dos sistemas de dos componentes en *Bordetellas*. Así la máxima expresión de los factores Bvg-reprimidos requiere de la presencia del componente regulatorio RisA [266]. Más aún, el sistema RisAS posee un efecto sinérgico con factores Bvg-reprimidos frente a la exposición bacteriana a condiciones externas de stress oxidativo [95]. De manera similar, como hemos mencionado anteriormente al menos uno de los componentes del sistema TtrRS sería bvg-reprimido [265].

Los resultados aquí descriptos sin dudas abren un camino interesante de ser profundizado en *B. bronchiseptica*.

BB1884, probable transportador de solutos

Esta proteína, identificada en las FPC, duplica su concentración en la condición de crecimiento a pH: 5,50 respecto a pH: 7,20. La escasa información que poseemos en cuanto a su posible rol biológico proviene de lo anotado en la sección *Conserved Domains* del sitio web de NCBI [252]. Según ésta, la secuencia anotada para el ORF BB1884 posee un dominio del tipo cl01709. Este tipo de dominios está presente en los dominios periplásmicos de transportadores de sustratos del tipo ABC involucrados en el transporte de Ni⁺² ó de dipéptidos a oligopéptidos. Adicionalmente, una subclase de estos dominios está presente en una superfamilia de proteínas que incluye además receptores ionotrópicos de glutamato, reguladores transcripcionales del tipo LysR y sensores proteicos no ortodoxos. Su rol en relación a cambios en el pH del medio permanece, al menos al momento, elusivo.

BB0111, posible deshidrogenasa

BB0111, identificada en los FPS de pl 6-11, incrementa notablemente su expresión (11 veces) en los cultivos realizados a pH: 5,50 respecto a los de pH: 7,20. Su función biológica en *B. bronchiseptica* no ha sido reportada aún en la literatura. En base a homología de secuencias con otras proteínas, en el sitio web del KEGG, BB0111 es descrita como la enzima colina deshidrogenasa, la cual cataliza la transformación oxidativa de colina en betaína aldehído según la siguiente reacción (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?bbr:BB0111):



La colina deshidrogenasa es una quinoproteína, asociada a membrana, que emplea como cofactor a la pirroloquinolina quinona (C₁₄H₆N₂O₈) [267]. La betaína aldehído suele ser posteriormente transformada en animales, bacterias y plantas en betaína. De acuerdo a lo señalado el referido mapa metabólico de *B. bronchiseptica* en el sitio web del KEGG, la betaína sería un metabolito final para esta bacteria, al no presentar su genoma ORF que codifiquen proteínas que puedan metabolizarlo.

La betaína generada en la reacción catalizada por BB0111 tendría un rol principal, en función de lo mencionado en la literatura para otros organismos, como sustancia osmoprotectora [267-268]. Por lo tanto, la inducción de su expresión en

condiciones de stress ácido podría obedecer a una respuesta general de stress abiótico. Adicionalmente, los autores del trabajo [267] han postulado un potencial papel alternativo de esta enzima como oxidasa final en condiciones de anaerobiosis. Esto último si bien difícil de interpretar en nuestro caso por tratarse como ya se ha hecho mención de un microorganismo aerobio estricto, podría eventualmente tratarse de algún tipo de resabio evolutivo de un antecesor capaz de crecer en condiciones anaerobias.

BB3594, proteína hipotética

El *spot* correspondiente a la proteína codificada por el ORF BB3594 fue detectado en las FPC, exclusivamente en la condición ácida de cultivo. La proteína codificada por este ORF posee similitud con varias proteínas involucradas en la regulación de la formación y acumulación del compuesto polimérico Poli- β -hidroxibutirato o PHB (<http://www.genome.jp/kegg/ssdb/>). La secuencia que codifica para BB3594 se encuentra ubicado a continuación y en el mismo sentido que los genes BB3595 y BB3596 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Estos últimos ORF corresponden a una proteína 3-cetoacil-(acil-proteína) reductasa y a una PHB polimerasa, respectivamente. En algunas especies bacterianas, los genes que codifican para la formación de PHB se encuentran agrupados en la misma región cromosomal, siendo la proteína que muestra mayor similitud con BB3594 un represor transcripcional tanto del gen de la PHB polimerasa como de su propio gen, denominado PhaR [269]. PhaR es capaz de unirse además al polímero de PHB y al hacerlo, deja de reprimir tanto su síntesis como la del gen de la polimerasa. Luego, tanto la expresión de *phaR* como la del gen de la PHB polimerasa son inducidas en condiciones de acumulación de PHB.

La síntesis de PHB ha sido poco estudiada en las Bordetellas [270]. La presencia de BB3594 podría llevar a una mayor acumulación de PHB a pH: 5,50 respecto a pH: 7,20. De acuerdo a lo estudiado en *B. pertussis*, esto coincidiría con una elevada relación en la disponibilidad de sustrato respecto a la velocidad de crecimiento para bacterias cultivadas en medio ácido respecto a aquellas cultivadas en medio neutro. De hecho, como se ha detallado en secciones precedentes, la velocidad específica de crecimiento para *B. bronchiseptica* mostró ser mayor durante el cultivo a pH 7,20 que a pH 5,50. En relación a esto, la determinación del contenido de PHB en bacterias provenientes de cultivos en ambas condiciones nos permitiría tener un indicio fuerte de la validez o falsedad de esta hipótesis.

Detección de la expresión de Bacterioferritina (Bfr)

Como resultado de nuestro estudio de diferencias en la expresión proteica con el pH del medio de cultivo, hemos detectado alteraciones en la expresión de algunas proteínas posiblemente vinculadas con el metabolismo del Hierro. El estudio metabolismo del hierro en *B. bronchiseptica* se ha limitado mayormente a una serie de mecanismos que dispone éste patógeno para secuestrar hierro a partir del huésped durante su tránsito in vivo. Estos incluyen, al sideróforo Alcaligina (FauA), el xenosideróforo Enterobactina (BfeA) y los sistemas de captura de Hemina (BfrH) y Hemoglobina (BhuR) [188-189, 191]. La expresión de todos ellos tiene, en mayor o menor grado, efectos sobre el desarrollo del proceso infeccioso [188]. En contraste, las

proteínas Ferritina y Bacterioferritina, aunque presentes en el genoma secuenciado de *B. bronchiseptica* (ORF BB0253 y BB4918, respectivamente), han concitado escaso interés. Sin embargo estas proteínas en otros patógenos tienen importantes propiedades inmunogénicas [237-239]. Dada estas propiedades decidimos confirmar los resultados encontrados respecto a la expresión diferencial dependiendo la acidez de medio. Para ello clonamos y purificamos a la proteína Bfr para luego obtener anticuerpos anti-Bfr de forma de realizar luego ensayos de inmunoblot.

Los anticuerpos así obtenidos fueron enfrentados a los extractos proteicos obtenidos de las dos condiciones de acidez estudiadas. En la siguiente Figura se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos experimentalmente.

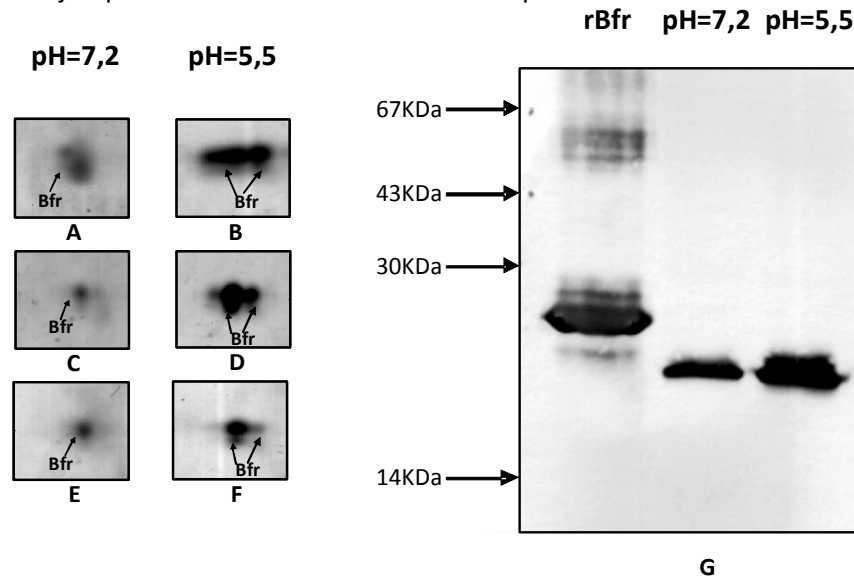


Figura 3.19 Inmunoblot empleando como anticuerpo al suero obtenido de ratones inmunizados con la proteínas Bfr de *B. bronchiseptica*.

En los paneles A-F se muestran las diferencias de los niveles de expresión detectados para la proteína Bfr. En el panel G se muestran los resultados obtenidos a partir de los extractos proteicos bacterianos provenientes de aproximadamente $4,5 \times 10^6$ bacterias. Como control positivo se incorporó a la proteína purificada rBfr (100 ng). Para la inmunodetección se empleó un segundo anticuerpo anti Ig G conjugado a la enzima fosfatasa alcalina cuya presencia fue revelada a partir de los sustratos NBT (Cloruro de Azul Nitro-tetrazolio) y BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indoilfosfato de p-toluidinio).

Como puede apreciarse en la Figura 3.19, la reactividad frente al suero anti Bfr fue mayor en la condición de pH:5,50 corroborando los resultados obtenidos en los geles 2D-PAGE. En la Figura se observa además un retraso en la movilidad electroforética en la proteína recombinante respecto a las proteínas provenientes de ambos extractos de proteínas totales de *B. bronchiseptica*. Este retraso es producto de la incorporación previa de un breve segmento C-terminal de seis histidinas en la proteína recombinante, necesario en el proceso de purificación.

Estos resultados nos estimulan a planificar a futuro una profundización en el estudio de las características biológico-funcionales, inmunológicas y el probable efecto en la relación patógeno-huésped de esta proteína en *B. bronchiseptica*.

Evaluación de rol in vivo del fenotipo resistente a la acidez

La caracterización molecular realizada nos ha permitido detectar, como hemos descrito más arriba efectos de la acidez sobre componentes de la membrana bacteriana de *B. bronchiseptica*. Dada la localización de estos cambios, los mismos podrían impactar en la relación del patógeno con el huésped. A continuación comentaremos algunos resultados que obtuvimos de ensayos preliminares realizados para analizar de manera el efecto de esos cambios en las primeras horas de una infección en el modelo de ratón. Para ello infectamos en forma paralela 2 grupos de ratones con suspensiones bacterianas provenientes de las 2 condiciones de acidez estudiadas. Incluimos además un tercer grupo de ratones infectado con bacterias en fase virulenta a modo de control de infección.

Los ratones pertenecientes a cada uno de los tres grupos fueron sacrificados a las 2 y 48 horas posteriores a la infección. A partir de los pulmones extraídos de estos ratones se realizaron homogenatos de forma de luego plaquearlos para analizarlas el número de bacterias que se encuentran colonizando dicho tejido. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.20.

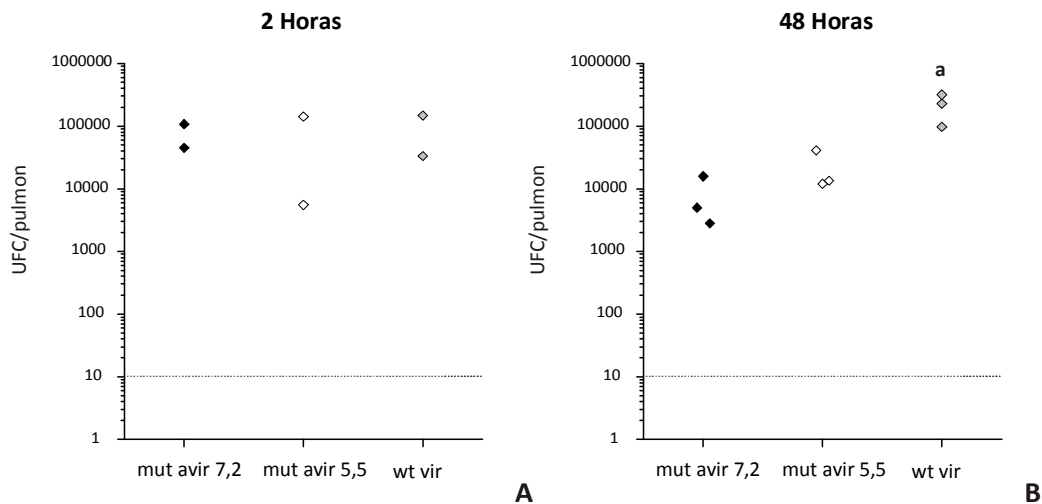


Figura 3.20. Colonización bacteriana de *B. bronchiseptica* $\Delta bvgA$ en ratones Balb/C.

En esta figura se muestran los recuentos de las bacterias viables recuperadas de los pulmones de los ratones infectados. En el panel A se representaron los datos obtenidos a las 2 horas y en el panel B los obtenidos a las 48 h. El (◆) se empleó para representar a los datos provenientes de los ratones infectados con las bacterias cultivadas a pH: 7,20, mientras que el símbolo (◇) lo empleamos para los correspondientes a las infecciones con las bacterias cultivadas a pH: 5,50. El tercer grupo inoculado con bacterias en fase virulenta fue representado con el siguiente símbolo (◇). Las diferencias observadas entre los grupos a un tiempo determinado con significación estadística ($\alpha < 0.05$) están señaladas en el gráfico con el símbolo (a). Se ha señalado adicionalmente con una línea punteada el límite de detección experimental

Aunque preliminares, estos datos muestran que solamente la cepa salvaje en fase virulenta es la única capaz de multiplicarse luego de transcurridas 48 horas desde su inoculación. Por su parte los grupos de ratones infectados con el mutante avirulento poseen valores de recuento de bacterias en pulmones iguales o inferiores a las 48 h post-infección, respecto a los valores hallados a las 2 h. Resulta interesante destacar que los recuentos a las 48 h fueron levemente superiores para las bacterias previamente incubadas a pH: 5,50 respecto de sus pares provenientes de cultivos a pH: 7,20.

Estos ensayos los repetimos con 5×10^6 UFC en el inóculo pero analizando el número de bacterias en los pulmones a las 72 h post infección. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.21. Al igual que en el ensayo anterior, a las 2 h de producida la infección se observaron recuentos comparables en ambos grupos de ratones (datos sin mostrar). Sin embargo a las 72 h se observan diferencias con una tendencia superior las bacterias cultivadas a pH: 5,50.

Los resultados anteriores, si bien preliminares, son promisorios. Esperamos profundizar en ensayos futuros, tanto en modelos de infección como el empleado, como en experimentos de invasión/adhesión en cultivos de células eucariotas, el análisis de los posibles efectos de la acidez sobre la interacción patógeno-huésped.

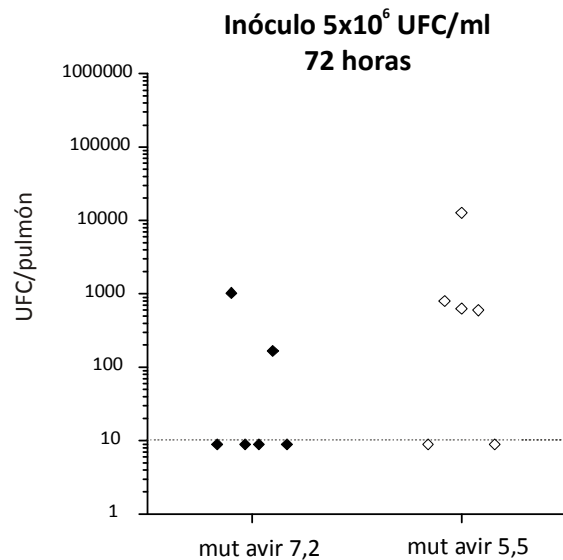


Figura 3.21 Ensayo de sobrevivencia bacteriana a 72 horas post-infección.

Se muestran los recuentos de bacterias viables por pulmón detectados 72 horas después a la inoculación, en dos grupos de 6 ratones de 5×10^6 UFC en $50 \mu\text{l}$ del mutante avirulento $\Delta bvgA$. Los ratones se agruparon según hubieran sido inoculados bacterias previamente incubadas en medio SS modificado a pH 5,50 (◇) o pH 7,20 (◆). Se ha señalado en línea punteada el límite de detección.

Discusión

En capítulos anteriores hemos demostrado que *B. bronchiseptica* es capaz de sobrevivir en medios de cultivo con pHs tan bajos como pH: 4,0. Esta capacidad resultó ser más evidente en bacterias que expresan el fenotipo avirulento. Más aún, esta fase mostró la capacidad de desarrollar una respuesta de tolerancia a la acidez (ATR). Estos datos, si bien se han reportado para otros patógenos, resultan novedales para *B. bronchiseptica*.

Durante la caracterización molecular de las bacterias que son capaces de desarrollar la respuesta ATR, hemos detectado la presencia de un perfil electroforético modificado para el LPS. Normalmente este componente superficial se resuelve en geles SDS-PAGE en dos bandas que se designan con las letras A y B, y varias bandas que incluyen las estructuras del LPS asociadas al homopolímero 2,3-dideoxi-2,3-di-N-acetilgalactosaminurónico (2,3-di-NAcGalA) que se denomina antígeno O. La banda A está constituida por el lípido A, el core y un trisacárido externo, la banda B se compone de los constituyentes de la banda A pero sin el trisacárido y las otras bandas de menor migración se corresponden a la estructura del LPS completo que contiene al antígeno O en distinto grado de síntesis [129, 131, 196, 271-272]. En los ensayos descritos en este capítulo hemos observado que el cultivo de *B. bronchiseptica* a pH 5,50 lleva a la síntesis de un LPS en el que la Banda A y la banda que contiene al antígeno O, se encuentran disminuidas en intensidad. También se observó en dicho LPS un retraso en la movilidad electroforética de la banda que contiene al antígeno O. Este retraso en la movilidad electroforética ha sido descrita para el LPS de *B. bronchiseptica* en fase avirulenta probablemente como consecuencia de una inhibición de la deamidación de los residuos uronámidos mediada por la proteína periplásmica WbmE. Como consecuencia de la acidificación del medio la inhibición de esta enzima podría verse exacerbada.

En otras bacterias como *Salmonella typhimurium* también se han detectado cambios en la estructura del LPS en respuesta a la acidez. Estos cambios que involucran el reemplazo de los grupos fosfato del lípido A por azúcares con carga positiva, son mediados por 2 sistemas de dos componentes, PhoPQ y PmrAB [213, 273-274]. Estas modificaciones en el LPS protegerían a la bacteria de los efectos deletéreos de péptidos antimicrobianos conocidos con el nombre de defensinas [274-275].

Para el análisis de los componentes proteicos de las bacterias adaptadas a la condición de estrés, trabajamos con las fracciones subcelulares citosólicas (FPC) y de membrana o superficie (FPS). Estas fracciones fueron obtenidas mediante la técnica descrita por Molloy [276-278] la cual permite la solubilización de las proteínas a través de buffers que son compatibles con la técnica de electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE). La complejidad en la composición de las muestras así obtenidas resultó ser comparable con la descrita para otras bacterias gram negativas como *E. coli*, *S. typhimurium* y *Klebsiella aerogenes* [276-277].

La detección e identificación de proteínas específicas de cada localización validó la estrategia de fraccionamiento empleada. Más aún, en el caso de la fracción conteniendo los componentes de la superficie bacteriana, pudimos detectar a la proteína B3736 cuya hidrofobicidad expresada con el valor de GRAVY de +0,147 resultó ser comparable a los máximos alcanzados por otros autores que han empleado metodologías similares a la nuestra [276, 279].

Las fracciones FPC y las FPS analizadas incluyeron un total de 614 *spots* o subunidades proteicas, es decir un 12.3% de los 4994 ORF presentes en el proteoma *in sillico* de la cepa de *B. bronchiseptica* RB50. Del total de *spots* analizados, 25 resultaron diferenciales para las distintas condiciones de pH. Estas diferencias representan el 4 % del total de *spots* y el 0,5 % del proteoma *in sillico*. Diecisiete de estos 25 *spots*, fueron inducidos en condiciones de acidez y 8 fueron reprimidos. Seis de las 17 subunidades peptídicas se expresaron sólo en la condición de crecimiento en medio ácido. Por su parte, 2 de las 8 subunidades polipeptídicas que no se detectaron en condiciones de acidez, lo han hecho de manera absoluta en la condición de pH: 7,20. Estos resultados son comparables a los reportados para otros patógenos intracelulares facultativos como *S. typhimurium* que constituye un ejemplo prototipo de respuesta ATR. En este patógeno la acidez altera la expresión de alrededor de 50 proteínas [213]. Estudios de caracterización molecular de respuesta ATR en esta bacteria, muestran diferencias de expresión en 18 *spots* [206]. Los cambios detectados en esta bacteria también representaron 0,4% del proteoma *in sillico* (número total de ORF en esta bacteria es 4423 [280]). De los 18 *spots* detectados como diferenciales en *S. typhimurium*, 12 resultaron inducidos y 6 reprimidos en las condiciones de crecimiento en medio ácido.

Otra bacteria que también posee una capacidad de respuesta a la acidez del tipo ATR es la *Listeria monocytogenes* [207, 218, 281]. Esta bacteria en condiciones de acidez induce la expresión de 30 subunidades polipeptídicas (6 de ellos de manera absoluta) y la represión de 8 subunidades polipeptídicas [230]. Siendo que el número estimado de ORF en el genoma secuenciado de esta bacteria está en torno a 2800, el número de *spots* diferenciales equivale al 1,4% del proteoma *in sillico* [282]. Por último, en el caso de *Brucella melitensis*, si bien su capacidad de respuesta ATR no ha sido evaluada, se dispone de datos referidos a la caracterización molecular de los efectos de un *stress* ácido de magnitud equivalente al evaluado por nosotros (pH: 5,50) [283]. Para esta bacteria, sobre un total de 676 *spots* analizados, 33 tuvieron una expresión diferencial con la acidificación del medio. El número de *spots* analizados correspondió al 32,2% de los 2100 ORF presentes en el genoma secuenciado y las diferencias detectadas correspondieron al 4,9% de los *spots* analizados y al 1,6% del proteoma *in sillico* [284].

Todos estos datos nos muestran que los cambios detectados con la acidificación del medio en proteínas totales de *B. bronchiseptica* resultan comparables a la de otros patógenos.

La proporción de *spots* detectados como diferenciales en la fracción proteica de superficie fue el doble que la detectada en las FPC (6,3% de 144 totales vs 3,2% de 464, respectivamente). Foster y Hall dos décadas atrás también observaron en el caso de *S. typhimurium* un predominio en proteínas asociadas a membranas (14 de 18) dentro de las expresadas de manera diferencial de acuerdo a la condición de acidez [206]. Los efectos de la acidez parecen tener así, una mayor implicancia sobre moléculas constituyentes de la superficie del patógeno. Estos cambios revisten especial interés para el caso de patógenos de mucosas como *S. typhimurium* o *B. bronchiseptica*, dado que ocurren en estructuras en estrecho contacto con el huésped.

Dentro de las proteínas asociadas a membrana afectadas por la condición de acidez, se encuentran la Bacterioferritina (Bfr) y una de las isoenzimas de la cisonitato hidratasa (AcnA). Estas proteínas tienen importancia biológica ya que están

relacionadas con la biodisponibilidad intracelular de hierro. Los cambios en la expresión de estas proteínas reflejarían una alteración en el metabolismo del hierro a expensas de la acidificación del medio similar a lo descrito para bacterias como *S. typhimurium*, *Shewanella oneidensis* y *H. pylori* [208, 273-274, 285-286]. El principal responsable de la regulación de estos cambios en aquellas bacterias es el regulador transcripcional Fur (Ferric uptake regulador). En el caso de *B. bronchiseptica*, las proteínas inducidas en condiciones de acidez también son reguladas por Fur.

En resumen la caracterización molecular de los efectos de la acidez sobre *B. bronchiseptica* muestra mecanismos de adaptación similares a los previamente descritos en otros patógenos bacterianos de mucosas. Así, la exposición a entornos ácidos pareciera desencadenar una serie de cambios comunes en varias especies bacterianas sobre estructuras en estrecho contacto con el entorno. Es de esperar que estos cambios posean un alto impacto en la relación del patógeno con sus huéspedes. En línea con esta hipótesis, los ensayos preliminares realizados empleando el modelo de infección de ratones, sugieren que la acidez altera la interacción de la bacteria con componentes de la mucosa respiratoria.

Capitulo 4

Conclusiones generales

Conclusiones generales

La infección de un huésped por un microorganismo patógeno puede ser dividida en tres etapas: colonización, invasión de los tejidos y proliferación en el sitio colonizado [5]. Durante estas etapas, los patógenos enfrentan cambios del entorno que en general representan condiciones de estrés como pueden ser la escasa disponibilidad de hierro u otros iones, aumentos de temperatura, alteraciones en la osmolaridad del medio, cambios de pH, etc [287]. Dependiendo de la severidad y duración del estrés, el crecimiento de los microorganismos puede verse inhibido o incluso pueden perder viabilidad.

La capacidad de adaptación de las bacterias patógenas para tolerar aquellos ambientes injuriantes, juega un papel determinante para el éxito como patógenos. En el caso de las infecciones en la vía respiratoria, la acidez causada en las mucosas por el proceso inflamatorio local [201-203] y en el fagolisosoma durante su tránsito intracelular [288], actúan como barrera para el progreso de la infección. Los microorganismos por su parte, frente a la acidez modifican su virulencia de forma de incrementar las probabilidades de colonizar el tracto respiratorio y de sobrevivir en nichos intracelulares.

Los mecanismos de respuesta a la acidez desarrollados por los patógenos cuyo pH óptimo de crecimiento se encuentra próximo a la neutralidad (neutralófilos) pueden clasificarse en tres. El primero de estos mecanismos representa una adaptación a condiciones moderadas de acidez, pHs entre pH: 5,5 y pH: 6,0 aproximadamente. En estas condiciones se induce la síntesis de un grupo de proteínas (18 proteínas por ejemplo para el caso de *S. typhimurium*), que mantienen la homeostasis de pH intracelular y protegen a la bacteria frente a condiciones más extremas de acidez (por ejemplo pH: 3,0) [205]. Este mecanismo se conoce como “respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez” (ATR). La respuesta ATR, luego de su detección hace 20 años atrás en *E. coli* y *S. typhimurium*, puede considerarse actualmente como un mecanismo general tanto en bacterias gram negativas como gram positivas [206-208]. El segundo mecanismo corresponde a la respuesta al estrés ácido que se desarrolla cuando la bacteria se enfrenta a condiciones extremas de acidez (pH: 4,3 o incluso inferiores, para el caso de *S. typhimurium*) [209]. Este mecanismo involucra la síntesis de un número mayor de proteínas (aproximadamente 52 proteínas en *S. typhimurium*). El tercer mecanismo, denominado *aclimatación*, le permite a los microorganismos no sólo sobrevivir sino además replicarse en condiciones drásticas de acidez [210]. El caso mejor estudiado es el de *H. pylori*, una bacteria neutralófila capaz de multiplicarse y mantenerse de manera estable durante años en el estómago de humanos cuyo pH puede llegar a ser cercano a pH: 1,0.

En el caso de *B. bronchiseptica*, si bien ha sido reconocida su capacidad de resistir a condiciones restrictivas de nutrientes y de estrés [36, 193, 220, 289], su comportamiento frente a la acidez ha sido poco estudiado. En nuestro conocimiento existe un único trabajo que ha evaluado los efectos de esta condición medioambiental sobre el patógeno [97]. Los autores de dicho trabajo, muestran que cultivos bacterianos expuestos a valores de acidez tan bajos como pH: 4,0 se mantienen con recuentos de microorganismos estables (resistencia a la acidez, AR). En las condiciones experimentales empleadas en aquel trabajo no se detectó una respuesta adaptativa del tipo ATR para *B. bronchiseptica*.

Durante mi trabajo de tesis he analizado el comportamiento de *B. bronchiseptica* cepa CIP 9.73 (Colección de cepas del Instituto Pasteur de París, Francia), frente a diferentes pH, empleando como base al medio sintético Stainer Scholte (SS) recomendado para el cultivo de *Bordetella* [217]. Coincidentemente con lo reportado por otros autores [97], he observado que *B. bronchiseptica* es capaz de sobrevivir y duplicarse en condiciones de acidez moderada (pH:5,50) pero es incapaz de multiplicarse a valores de pH extremos, cercanos a pH: 4,00. No obstante, en contraste con lo descrito en el trabajo más arriba mencionado, he evidenciado una capacidad de respuesta del tipo ATR en este patógeno. Esta respuesta ATR se mostró particularmente acentuada en bacterias que presentan un fenotipo avirulento. Este resultado reforzaría la hipótesis planteada por algunos autores respecto al rol de la fase avirulenta en el estadio crónico de la enfermedad, durante el cual las bacterias se encontrarían en un compartimento ácido (fagolisosoma, por ejemplo) [89, 92]. Según se describe en la literatura, la sobrevivencia intracelular de *B. bronchiseptica* en células fagocíticas ocurre sin alterar la maduración de los fagosomas [92, 97, 197]. Las vesículas fagolisosomales maduras conteniendo al patógeno alcanzan un valor de pH final cercano a pH: 5,10, que es superior al mínimo que la bacteria puede resistir [97]. Esto indicaría que la sola acción de la acidez fagolisosomal no representa en sí misma una condición letal para este patógeno. Llamativamente, la inhibición de la acidificación del compartimento fagolisosomal ha mostrado incrementar la sobrevivencia intracelular de *B. bronchiseptica* en células macrofágicas [97]. Este comportamiento podría ocurrir si la bacteria fuera capaz de desarrollar una respuesta a la acidez del tipo ATR.

Estos antecedentes, junto con la detección de ATR en nuestras condiciones experimentales, han servido de base para plantearnos como objetivo la caracterización molecular de este tipo de respuesta en *B. bronchiseptica*. Los resultados obtenidos nos ha permitido detectar alteraciones cuali y cuantitativas en la movilidad electroforética del lipopolisacárido (LPS) de esta bacteria. Como ha sido descrito en detalle en el correspondiente capítulo de resultados, la incubación bacteriana en medio ácido produce alteraciones tanto en la banda A del LPS como en las bandas correspondientes al LPS que contiene antígeno O. Estos cambios son interesantes ya que se ha reportado que ambos influyen decisivamente en la colonización del tracto respiratorio del ratón [129-130].

Por su parte, los ensayos de proteómica comparativa permitieron extender las diferencias observadas a componentes bacterianos de naturaleza proteica. En particular detectamos 25 subunidades proteicas diferenciales de un total de 614 detectadas en los geles 2D-PAGE. Estas diferencias involucraron fundamentalmente a proteínas de membrana. Estos resultados coinciden con lo reportado en el ejemplo más estudiado de respuesta ATR, *S. typhimurium* [206]. Dentro de las proteínas diferenciales resulta interesante mencionar a una isoenzima de la Aconitasa A (AcnA) y la proteína Bacterioferritina (Bfr). Estas proteínas están involucradas en el metabolismo del Fe cuya biodisponibilidad se asocia con el desarrollo de los procesos infecciosos [231, 234-235, 247]. Los cambios de expresión observados, probablemente obedezcan a un aumento de la disponibilidad de hierro en el medio ácido. Este resultado concuerda con lo reportado para otros patógenos de mucosas, como *S. typhimurium*, *H. pylori* y *Shewanella oneidensis* [190, 208, 274, 285, 290-291].

En base a los resultados alcanzados y en conjunto con los datos previamente reportados, podríamos proponer el siguiente modelo sobre el ciclo biológico de *B. bronchiseptica* (Figura 4.1).

La bacteria ingresa al huésped ya sea del medio ambiente como fomas o a partir de la proyección de secreciones de un individuo infectado (paso 1 de la Figura 4.1). Para esta etapa se ha descrito a la fase avirulenta como la más adecuada [38, 292].

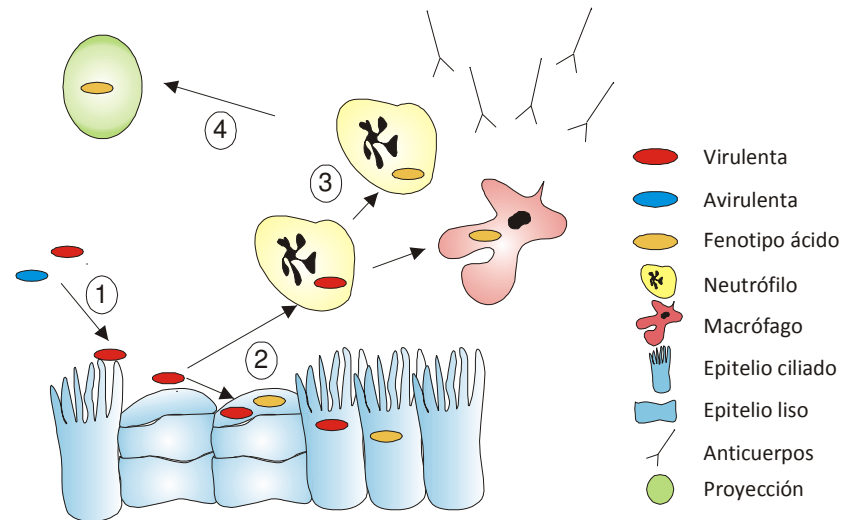


Figura 4.1. Representación del ciclo biológico propuesto para *B. bronchiseptica*.

Dentro del huésped, en respuesta a señales aún no identificadas, se activa la expresión de los factores de virulencia conocidos. Estos factores son esenciales durante las primeras etapas de colonización y evasión de la respuesta inmune desencadenada [15, 35-36, 39]. De la interacción de determinados componentes bacterianos con receptores específicos del huésped (por ej., LPS y TLR4), se induce un proceso inflamatorio local, llevando al influjo de células fagocíticas provenientes de la circulación [35, 125, 133, 196]. Algunas bacterias pueden ser fagocitadas por células no especializadas (células epiteliales de la mucosa) así como también por neutrófilos provenientes de la circulación o macrófagos alveolares (paso 2 de la Figura 4.1). Este contexto inflamatorio conlleva una acidificación del líquido que recubre las mucosas (ASL) [201-203]. Así, tanto el espacio extracelular como el intracelular en contacto con la bacteria representan entornos ácidos, capaces de inducir o seleccionar cambios fenotípicos en las bacterias. La adaptación bacteriana conduciría a incrementar la resistencia a condiciones adversas como las encontradas en el interior de las células del huésped. Resulta importante volver a mencionar aquí que el fenotipo avirulento ha mostrado aventajar al virulento en su sobrevida intracelular [89, 92]. La sobrevida bacteriana en este nicho intracelular podrían conducir a una evasión de efectores de la respuesta inmune montada por el huésped tales como los anticuerpos [35, 71, 196, 293] (paso 3, Figura 4.1). La evasión sostenida de la respuesta inmune permite el establecimiento de una infección persistente con escasa o nula manifestación de sintomatología clínica. Una eventual reactivación del cuadro clínico conduciría a la expulsión de las bacterias durante los accesos de tos propios de la enfermedad. Las bacterias así liberadas al medio ambiente resistirían a este entorno restrictivo como consecuencia de la respuesta adaptativa puesta en marcha por su exposición previa a la acidez. La viabilidad bacteriana en este entorno medioambiental favorece la

diseminación de la bacteria, como por ejemplo formando parte de fomitas (paso 4, Figura 4.1).

En suma, la respuesta a la acidez en *B. bronchiseptica* tendría un importante rol a lo largo del ciclo biológico para este patógeno que no sólo es capaz de desarrollarse fuera del huésped sino también en uno más huéspedes pudiendo causar zoonosis.

Capitulo 5

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Medios y condiciones de cultivo

Conservación de cepas y material de partida para cultivos líquidos de *Bordetella bronchiseptica*

Las cepas de *Bordetella bronchiseptica* empleadas durante este trabajo de tesis fueron conservadas a -20°C como suspensiones bacterianas conteniendo 50% de glicerol (suspensiones *stock*). Para realizar los cultivos bacterianos se ha empleado como material de partida a los anteriores *stock* bacterianos, los cuales son cultivados en el medio sólido de Bordet y Gengou, suplementado con sangre de carnero defibrinada al 10% v/v (BGAS). Las placas sembradas fueron posteriormente incubadas en aerobiosis, a 37°C , durante 36 a 48 h. A partir de este desarrollo bacteriano se realizan repiques secundarios en BGAS con el fin de amplificar el material de partida para los cultivos en medio líquido en iguales condiciones de aerobiosis y temperatura, durante 24 h.

Los medios empleados en los cultivos líquidos a lo largo de este trabajo se basan en el medio recomendado para el cultivo de *Bordetella* spp. [217]. Se trata del medio de Stainer Scholte (SS) cuya composición se detalla a continuación

Tabla 5.1. Composición del medio base de Stainer Scholte (SS)

Medio base SS	
Glutamato de sodio monohidrato	10.7 g/l
NaCl	2.50 g/l
KCl	0.20 g/l
L- Prolina	0.24 g/l
KH ₂ PO ₄	0.50 g/l
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0.10 g/l
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.02 g/l
Tris-HCl	1.52 g/l

Este medio base se equilibra a pH 7,20 con HCl concentrado y se esteriliza en autoclave a 1 atmósfera de sobre-presión, durante 15 minutos.

Tabla 5.2. Composición del stock de complemento para medio Stainer Scholte

Complemento <i>Stock</i> (1000X, V _f =20 ml)	
L- Cisteína	800 mg
Ac. Ascórbico	400 mg
HCl(c)	2 ml
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	200 mg
Ac. Nicotínico	80 mg

El *stock* 1000X puede conservarse a -20°C hasta el momento de ser usado. Al momento de usar se adiciona 100 mg de Glutatión reducido cada 10 ml de complemento 1000X se diluye 1:10 con agua destilada (C_f= 100X) y se esteriliza por filtración (filtro de 0,2 mm de poro). Se adiciona 1 ml de complemento 100X por cada 100ml de medio Base SS estéril.

Tabla 5.3. Composición medio sólido Bordet Gengou suplementado con sangre (BGAs)

Medio BGAS	
Agar Bordet-Gengou (Difco®)	30 g/l
Peptona	10 % p/v
Glicerina	1 % v/v

Este medio se esteriliza en autoclave 15 minutos a 1 atmósfera de sobre-presión. Se deja enfriar y se adiciona sangre de carnero desfibrinada hasta una concentración final del 10%v/v.

Cultivos bacterianos para ensayo de respuesta ATR

Los cultivos bacterianos para los ensayos de ATR fueron realizados sobre medios de SS modificados. La modificación del medio SS original se realizó elevando la concentración original del buffer Tris-(hidroximetil) aminometano (Tris-HCl) de 12,5 mM a 20,0 mM. El ensayo de la respuesta ATR involucra la comparación de los resultados de dos cultivos realizados en paralelo a distintos valores de pH. Para aquellos cultivos realizados a pH cercano a la neutralidad (pH=7,20) se empleó Tris - HCl (pKa= 8,06 a 20°C) como compuesto buffer. En el resto de los casos el Tris fue reemplazado por el ácido 2-(N-morfolino) etil-sulfónico (MES, pKa= 6,15 a 20°C).

Las bacterias cultivadas en el medio BGAS según se describió más arriba fueron resuspendidas en medio líquido modificado SS (SSm) de pH apropiado y con estas resuspensiones fueron inoculados en paralelo dos medios líquidos, uno de pH neutro (cultivo control) y otro de pH moderadamente ácido (cultivo de adaptación). La densidad óptica (DO) inicial empleada para ambos cultivos, medida a una longitud de onda de 650 nm, ha sido de aproximadamente 0,200. Los cultivos fueron incubados en agitador orbital a 160 rpm, en condiciones de aerobiosis, a 37°C. Ambos cultivos se incubaron al menos durante dos tiempos de duplicación hasta alcanzar valores finales de DO_{650nm} entre 0,800 y 1,000. Las bacterias provenientes de estos medios fueron resuspendidos, en paralelo, en medios de pH igual al de los cultivos originales. La DO_{650nm} alcanzada por los cultivos al final del período de incubación ha sido de entre 0,800 y 1,000. Las bacterias provenientes de estos medios fueron empleadas para los experimentos de sobrevida a pH extremo y para realizar los estudios proteómicos.

Desafío ácido y evaluación de la sobrevida bacteriana

Los cultivos control y de adaptación, una vez transcurridas las dos incubaciones sucesivas de al menos dos tiempos de duplicación, fueron centrifugados a 10.000 x g durante 15 min en condiciones de esterilidad. Estos centrifugados bacterianos fueron posteriormente resuspendidos en medio SSm de pH ácido extremo apropiado, denominado medio de desafío ácido (pH: 4,00 para las cepas salvajes y pH: 3,80 para las cepas bloqueadas en fase avirulenta). Las condiciones de incubación empleadas fueron idénticas a las de los cultivos de partida, esto es, DO_{650nm} inicial aproximadamente 0,200, en agitador orbital a 160 rpm, en condiciones de aerobiosis y a 37°C. Se tomaron alícuotas de los cultivos de desafío a distintos tiempos de incubación, realizando diluciones seriadas en medio PBS estéril, depositando luego una alícuota de estas resuspensiones en medio BGAS. Las placas se incubaron en aerobiosis, a 37°C, durante 36 horas. De acuerdo con la macromorfología y presencia de marcadores de virulencia (ausencia o presencia de actividad hemolítica), las colonias resultantes fueron clasificadas en virulentas y avirulentas. En función de los recuentos bacterianos observados hemos se calculó la concentración bacteriana en los

cultivos originales y estos valores fueron posteriormente graficados en función del tiempo de incubación o exposición al pH de desafío.

Tabla 5.4. Composición química del buffer fosfato salino (PBS)

Medio salino PBS	
KH ₂ PO ₄	0.428 g/l
NaCl	7.20 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.39 g/l

Análisis de composición y perfil proteico

Obtención de proteínas totales de *B. bronchiseptica*

Las muestras fueron obtenidas a partir de cultivos bacterianos realizados en iguales condiciones y tiempos de incubación que aquellos empleados para el ensayo y evaluación de presencia de ATR. Al culminar el segundo período de multiplicación (DO_{650nm} final aproximada 0,800-1,000), las células cultivadas en estas condiciones fueron cosechadas por centrifugación de 1 ml de cultivo a 10.000 x g durante 30 min. y 4°C. El centrifugado bacteriano fue resuspendido en buffer Laemmli [294], con un volumen igual al necesario para obtener una concentración bacteriana equivalente a una DO_{650nm} de 10. El extracto proteico así obtenido luego de la lisis por calor será considerado “extracto enriquecido en proteínas totales”.

Tabla 5.5. Composición del buffer Laemmli

Buffer Laemmli, stock (4X, Vf=10 ml)	
SDS	0.8 g
Tris-HCl, 1M, pH=6,80	2.0 ml
Glicerina	4.0 ml
β-mercaptoetanol	2.0 ml
Azul de Bromofenol	0.02% p/v
Agua bidestilada	Hasta enrase

Obtención de fracciones proteicas de *B. bronchiseptica* para 2D-PAGE

Las muestras fueron obtenidas a partir de cultivos bacterianos realizados en iguales condiciones y tiempos de incubación que aquellos empleados para el ensayo y evaluación de presencia de ATR. Al culminar el segundo período de multiplicación (DO_{650nm} final aproximada 0,800-1,000), las células cultivadas en estas condiciones fueron cosechadas por centrifugación a 10.000 x g durante 30 min. a 4°C. El centrifugado celular obtenido se lavó dos veces con buffer Low Salting (LS). Las células lavadas, fueron resuspendidas en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8,40, conteniendo como inhibidor de serino proteasas al agente Fluoruro de polimetilsulfóxido (PMSF, concentración final 0,25 mM). La densidad bacteriana en la suspensión se llevó a un valor de DO_{650 nm} de 10. Esta suspensión fue sometida a un proceso de ruptura física por ultrasonido, con sonicador de punta de 1/8 de pulgada (150 Digital Sonifier®, Branson) bajo enfriamiento con mezcla de agua hielo. Se realizaron series de seis pulsos de 6 watts de potencia, con un minuto y medio de duración por treinta segundos de descanso, hasta clarificación apreciable y sostenida de la resuspensión bacteriana. Las células intactas fueron finalmente separadas por centrifugación (30 min, 10.000 x g y 4°C). El sobrenadante, correspondiente al lisado libre de células

intactas, fue tratado con DNAasa I (0.62 U DNAasa/ml de lisado) y Ribonucleasa A (8 µl de 10mg/ml, cada 10 ml de lisado) durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente se procedió a ultracentrifugar (Beckman Coulter Optima LE-80K) el lisado durante 10 minutos a 20.000 rpm en el Rotor70Ti a 4°C, para minimizar la presencia de células bacterianas intactas. El sobrenadante de esta ultracentrifugación fue sometido finalmente a una ultracentrifugación durante dos horas, a 30.000 rpm (Rotor70Ti) y 4°C. El pellet obtenido corresponde a una fracción enriquecida en proteínas de membranas, mientras que el sobrenadante fue considerado una fracción enriquecida en proteínas citosólicas.

El sedimento obtenido en la ultracentrifugación fue resuspendido ON a 4°C, en buffer UTIT y precipitado con cuatro volúmenes de acetona fría, a -20°C, durante 3 horas. Este precipitado fue centrifugado a 10.000 x g, 10 min y 4°C y lavado dos veces con acetona fría al 90% en agua bidestilada. El precipitado acetónico se dejó secar a temperatura ambiente hasta casi sequedad y resuspendido en 100 µl cada 200 ml de cultivo original de buffer UTC, bajo agitación orbital a 4°C durante toda la noche. Una nueva precipitación en baño de agua hielo se realizó con ácido tricloroacético (TCA), concentración final de 10% p/v y la adición del detergente Tritón X100 para favorecer la resuspensión. Para separar el precipitado se realizó una centrifugación a 20.000 x g y 4°C, descartando el sobrenadante. El precipitado así obtenido fue resuspendido en 100 µl de buffer UTC cada 200 ml de cultivo bacteriano original, ON bajo agitación orbital a 4°C, con el agregado de 0,5% v/v de anfolitos y 1% v/v del agente reductor comercial DeStreak (GE-Healthcare). El extracto proteico obtenido será considerado un extracto enriquecido en proteínas no citosólicas (FPS).

Obtención de un extracto enriquecido en proteínas citosólicas

El sobrenadante de la ultracentrifugación de 2 h a 4°C, 30.000 rpm (Rotor 70Ti) fue precipitado con 4 volúmenes de acetona fría, a -20°C, durante 3 h. El sedimento se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4°C y se lavó dos veces con acetona fría al 90% en agua bidestilada. El precipitado así obtenido se resuspendió, bajo agitación orbital, ON a 4°C, en 1 ml cada 200 ml de cultivo original, de buffer UTC. Finalmente, se adicionó un volumen de buffer UTC sin Chaps, resuspendiendo bajo agitación orbital a 4°C, ON. El extracto proteico obtenido fue considerado un extracto enriquecido en proteínas citosólicas (FPC).

Tabla 5.6. Soluciones empleadas en la extracción y resuspensión de extractos proteicos.

Buffer LS		Buffer UTC		Buffer UTIT	
KCl	3 mM	Urea	7 M	Urea	7 M
NaCl	68 mM	Tiourea	2 M	Tiourea	2 M
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	Chaps	4 %p/v	Isopropanol	10 % v/v
NaH ₂ PO ₄	9 mM			Tritón X100	2 % v/v

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en el extracto FPC se realizó mediante la técnica de Bradford [295], empleando para ello el reactivo comercial de BioRad® y como proteína estándar a la Seroalbúmina bovina (BSA por su acrónimo en inglés, 1 mg/ml).

Extracto enriquecido en proteínas no-citosólicas

La naturaleza de las proteínas no-citosólicas y en particular aquellas particularmente hidrofóbicas, como las de membrana, hacen más adecuado el empleo de técnicas no tradicionales para la cuantificación de proteínas. El sistema de detección 2D Quant kit® (Amersham Biosciences) es relativamente indiferente a la naturaleza de las cadenas laterales de los aminoácidos individuales que componen las cadenas polipeptídicas. Se basa específicamente en la interacción del ión cobre con los grupos carbonilo y amino del enlace peptídico. De esta manera, la interacción de todas las proteínas será similar, indiferentemente de la naturaleza y composición aminoacídica de cada proteína en particular. A su vez, posee una alta tolerancia a los agentes solubilizantes comúnmente empleados en la resuspensión proteica.

El protocolo de determinación cuantitativa de proteínas en los extractos enriquecidos en proteínas no-citosólicas empleado fue el descrito por el fabricante. Brevemente, este método consiste en un paso de precipitación de las proteínas del extracto, seguida de un paso de centrifugación en microfuga y descarte del sobrenadante. A continuación se resuspende el centrifugado en solución de Cu (II) y se agrega finalmente un reactivo de trabajo, capaz de formar un complejo coloreado con el Cu(II) libre (no unido a proteína). Se deja reaccionar durante 15 min. a temperatura ambiente y se procede a la lectura de la absorbancia de la suspensión a 480 nm. La determinación de la concentración de proteína será de manera indirecta, esto es, la Ab_{480nm} será proporcional al ión cobre que no se encuentre unido a las proteínas. Se empleó agua como blanco y una serie de diluciones de concentración conocida de seroalbúmina bovina (BSA) para construir una escala patrón.

Electroforesis unidimensional desnaturizante (1D-PAGE)

Las separaciones electroforéticas de los extractos proteicos fueron realizadas bajo condiciones desnaturizantes, de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli [296]. Las corridas electroforéticas se realizaron en equipos Miniprotean II® (BioRad), empleando separadores de 0,75 mm. Para mejorar la resolución de las proteínas en el gel de separación se empleó un gradiente discontinuo de concentración de poliacrilamida y pH. Este consiste en anteponer al gel de separación un denominado gel de stacking, de similar composición pero menor concentración de poliacrilamida y pH. Los volúmenes de extractos proteicos sembrados en cada una de las calles estuvieron comprendidos en el rango de los 5-25 μ l. La concentración de poliacrilamida en el gel de apilamiento por lo tanto fue de 4% y su pH: 6,80, mientras que los correspondientes valores para el gel de separación fueron 12,5 ó 15 % y pH: 8,80. La electroforesis fue realizada en condiciones de voltaje constante, en dos períodos. Al principio se usó un potencial de 80 volts hasta el ingreso del colorante al gel de separación, seguido de un incremento de potencial a 110 volts hasta el arribo del colorante al final del gel de separación. La tinción de los geles se realizó, dependiendo del caso, con Coomassie R-250, Coomassie coloidal ó nitrato de plata.

Tabla 5.7 Composición de los geles empleados en electroforésis unidimensional.

Gel de concentración (por gel Miniprotean II®)		Gel de separación (por gel Miniprotean II®)			Buffer corrida (por litro)	
Acil:Bis (30:0.8 %p/v)	162.5 µl		12.5%	15%	Glicina	6.0 gr
Tris-HCl pH=6.8	156.3 µl	Acil:Bis (30:0.8 %p/v)	2.08 ml	2.50 ml	Tris	28.8 gr
Agua bidest.	938 µl	Tris-HCl pH=8.8	1.87 ml	1.87 ml	SDS	1.0 gr
SDS 10 % p/v	12.5 µl	Agua bidest.	964 µl	548 µl		
PSA 10 % p/v	6.25 µl	SDS 10 % p/v	50 µl	50 µl		
TEMED	1.25 µl	PSA 10 % p/v	25 µl	25 µl		
		TEMED	2.5 µl	2.5 µl		

Electroforésis bidimensional en geles de poliacrilamida

Primera dimensión: Isoelectroenfoque

Extracto enriquecido en proteínas superficiales (FPS)

El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en geles de poliacrilamida deshidratados conteniendo gradientes de anfolitos inmobilizados (Inmobiline DryStrip®, Amersham Biosciences). La longitud de las tiras fue de 7 cm y se emplearon dos rangos de resolución de pI diferentes: 4 a 7 y 6 a 11. Las condiciones rehidratación y enfoque de las tiras para los dos diferentes rangos fue levemente diferente [224-225, 297-299].

Para el rango de separación de pI comprendido entre 4 y 7 se usaron aproximadamente 150 µg proteínas (determinados por medio de 2D Quanti kit®, Amersham Biosciences). El volumen de extracto correspondiente a la mencionada cantidad de proteínas fue llevado a un volumen final de 125 µl por agregado de Buffer UTC y adición del agente reductor Destreak® y anfolitos solubles, hasta lograr concentraciones finales de 12 µl/ml y 0,5% v/v, respectivamente. La rehidratación de las tiras comerciales fue realizada con voltaje constante de 30 V, durante 10-12 hs a 20°C, en el equipo Ettan IPG Phor I® (Amersham Biosciences). Se cubrió con aceite mineral para minimizar la deshidratación superficial y se aplicó el protocolo de corrida detallado al final de la sección.

Las tiras de rango de separación de pI comprendido entre 6 y 11 fue realizada con buffer UTC suplementado con el agente reductor comercial Destreak® y anfolitos solubles hasta lograr concentraciones finales de 12 µl/ml y 0,5 % p/v respectivamente. El período de rehidratación fue de 10-12 hs a 20°C y sin aplicación de potencial eléctrico. Una vez completado el período de rehidratación, la muestra fue aplicada por la metodología de "siembra en copa" (ó cup loading) anódica, de acuerdo a las recomendaciones de [225, 299]. Se aplicó el equivalente a aproximadamente 125 µg de proteínas de extracto, completando con buffer UTC, suplementado de manera similar al buffer de rehidratación, con anfolitos solubles y agente reductor. Por último se usó como colorante para seguir la corrida electroforética, Azul de Bromofenol hasta concentración final de 0,002 % p/v. Se cubrió con aceite mineral para minimizar la deshidratación superficial y se aplicó el protocolo de corrida detallado al final de la sección.

Una vez finalizado el paso de separación por IEF, las tiras fueron conservadas a -80°C hasta la realización de la segunda dimensión (SDS-PAGE).

Tabla 5.8. Protocolos empleados durante el Isoelectroenfoque de las FPS.

Protocolo pl 4-7 (7 cm)		Protocolo pl 6-11 (7 cm)	
Rehidratación	30V-10 hs	Ingreso (<i>step'n hold</i>)	30V-10hs
Paso 1 (<i>step'n hold</i>)	200 V-1 hs	Paso 1 (<i>step'n hold</i>)	200V-2hs
Paso 2 (<i>step'n hold</i>)	500 V-1hs	Paso 2 (<i>step'n hold</i>)	500V-2hs
Paso 3 (<i>step'n hold</i>)	1000 V-1hs	Paso 3 (<i>step'n hold</i>)	1000V-2hs
Paso 4 (<i>gradient</i>)	5000 V-30min	Paso 4 (<i>gradient</i>)	3500V-30min
Paso 5 (<i>step'n hold</i>)	5000 V - 10330V*hs	Paso 5 (<i>step'n hold</i>)	3500V - 16000V*hs

Extracto enriquecido en proteínas citosólicas (FPC)

Las resoluciones electroforéticas de las muestras enriquecidas en proteínas citosólicas fueron realizadas en el intervalo separativo de pl 4-7. Dada la mayor complejidad en su composición peptídica, se emplearon tiras de 18 cm de longitud. Las tiras fueron rehidratadas durante 10 hs a 20°C con 333 µl de buffer UTC modificado (surfactante Chaps al 2% en lugar de 4%), con la adición de 5,44 µl de Ditiotritol (DTT) 28 % p/v y 1.7 µl de anfolitos de pl 4-7. Transcurrido el tiempo de rehidratación se sembró la muestra por la metodología de siembra por copa (*cup loading*) anódico. La cantidad de muestra empleada fue la equivalente a 880 µg de BSA, según la técnica de Bradford en microplaca. La muestra fue llevada a un volumen total de aplicación de 100 µl, con buffer UTC modificado, adicionando DTT 28% p/v y anfolitos hasta concentración igual al de la solución de rehidratación de la tira. Por último se usó como colorante para seguir la corrida electroforética, Azul de Bromofenol hasta concentración final de 0,002 % p/v. Se cubrió con aceite mineral para minimizar la deshidratación superficial y se aplicó el protocolo de corrida detallado a continuación.

Tabla 5.9. Protocolos empleados durante el Isoelectroenfoque de las FPC.

Protocolo pl 4-7 (extr. Citosólicas)	
Ingreso (<i>step'n hold</i>)	30V-10hs
Paso 1 (<i>step'n hold</i>)	200V-2hs
Paso 2 (<i>step'n hold</i>)	500V-2hs
Paso 3 (<i>step'n hold</i>)	1000V-1hs
Paso 4 (<i>gradient</i>)	8000V-1hs
Paso 5 (<i>step'n hold</i>)	8000V-48000V*hs

Una vez finalizado el paso de separación por IEF, las tiras fueron conservadas a -80°C hasta la realización de la segunda dimensión (SDS-PAGE).

Segunda dimensión: electroforesis desnaturante en geles SDS-PAGE

Equilibración de las tiras

Antes de comenzar con la segunda dimensión (SDS-PAGE) se procedió a la reducción permanente de los grupos tioles (cadenas laterales de cisteínas) de las

proteínas. Para esto, en una primer etapa, se redujeron las cisteínas, incubando las tiras en buffer E suplementado con 1 % p/v de DTT, durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Luego se realizó una segunda etapa, de alquilación de los residuos reducidos, incubando las tiras durante una hora, en buffer E suplementado con 5.6 % p/v de Iodoacetamida (IAA), a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación.

Luego de realizado el proceso de alquilación/reducción, las tiras fueron sumergidas en buffer de corrida y depositadas sobre un gel de separación previamente armado (ver sección siguiente). A continuación, con el fin de minimizar problemas en la transferencia de proteínas desde el gel IEF al SDS-PAGE, las tiras fueron selladas sobre el gel de corrida mediante la adición de una suspensión 0,5 % p/v de agarosa en buffer de corrida, con azul de bromofenol al 0,01 % p/v como indicador de corrida, previamente calentados a 60°C. Una vez enfriada y gelificada la fase superior conteniendo a la tira de IEF, se procedió a la realización de la segunda dimensión.

Tabla 5.10. Composición de medios empleados durante la segunda dimensión electroforética.

Buffer E		Buffer corrida	
Tris-HCl, pH=8,80	50 mM	Tris,	25 mM
Urea	6 M	Glicina	192 mM
Glicerina	30 % v/v	SDS	0,1 % p/v
SDS	2 % p/v		

Corrida electroforética

De acuerdo a la longitud de las tiras de IEF, debieron emplearse sistemas de electroforesis vertical diferente para el SDS-PAGE. Las tiras de 7 cm fueron resueltas mediante el sistema Miniprotean II® de Biorad, en geles de 1,5 mm de espesor, con una concentración de poliacrilamida de 12,5%. Las electroforesis en este sistema fueron realizadas a potencial constante, comenzando durante 40 minutos a 60V y un segundo paso de 80 V hasta que el frente de corrida alcanzase el final del gel.

En el caso de las tiras de 18 cm, eliminamos en primer lugar 3 cm del extremo anódico para facilitar el ensamblado de los geles SDS-PAGE (este extremo no aporta proteínas de manera significativa, resultados sin mostrar). El sistema de electroforesis empleado en este caso fue el SE 600 Ruby® (Hofer, GE Healthcare). El espesor de los geles nuevamente fue de 1,5 mm, con una concentración de poliacrilamida del 12,5% p/v. En esta oportunidad debieron refrigerarse las corridas electroforéticas, realizándolas a una corriente constante de 20 mA por gel, hasta el arribo del frente de corrida al extremo inferior del gel.

Una vez finalizadas las corridas electroforéticas, los geles fueron teñidos mediante la técnica de Coomassie coloidal (ver a continuación).

Tabla 5.11. Composición de los geles de separación para los distintos tamaños de geles.

	Gel de separación	
	Mini Protean® II	SE 600 Ruby®
Acil:Bis (30:0.8 %p/v)	4,59 ml	14,60 ml
Tris-HCl 1,5 M (pH=8,80)	2,75 ml	8,75 ml
Agua bidest.	3,42 ml	10,89 ml
SDS 10% p/v	0,11 ml	0,35 ml
PSA 10 %p/v	0,11 ml	0,35 ml
TEMED	2,75 µl	8,75 µl

Tinción de geles y digitalización de imágenes

Coomassie R-250

Los geles fueron sumergidos inmediatamente después de la separación electroforética en solución de tinción. Se dejó incubar, con agitación, a temperatura ambiente, durante un tiempo no inferior a una hora. Transcurrido el período de tiempo de incubación se eliminó la solución de tinción, lavó con agua bidestilada y se incubó con solución decolorante, hasta decoloración del fondo del gel. Finalmente los geles fueron conservados en ácido acético al 1 % v/v en agua bidestilada.

Tabla 5.12. Soluciones de coloración empleadas en la tinción de Coomassie convencional.

Solución de tinción		Solución decolorante	
Agua bidest.	45 ml	Agua bidest.	50 ml
Metanol	45 ml	Metanol	40 ml
Ác. Acético	10 ml	Ác. Acético	10 ml
Coomassie R-250	0,2 % p/v		

Coomasie coloidal

Esta técnica de tinción, de similares principios a la metodología tradicional de tinción de proteínas Coomassie R-250, posee ciertos atributos que la hacen apropiada para la tinción de proteínas con fines cuantitativos. En primer lugar, su sensibilidad es superior a la de Coomassie R-250, habiendo sido incluso comparada a la de nitrato de plata [300]. A diferencia de la tinción con nitrato de plata y de manera similar a la de Coomassie R-250, posee un intervalo dinámico lineal de tinción de al menos dos órdenes de magnitud. Por último, la fijación del colorante es por simple depósito de este en forma de coloide, lo cual facilita su eliminación y minimiza el efecto de "fondo". Su desventaja es la mayor laboriosidad de la técnica y el tiempo elevado para arribar a punto final (al menos 24 hs).

Por las razones esbozadas anteriormente ha sido nuestra técnica de preferencia para el empleo en los ensayos de proteómica cuantitativa de expresión diferencial.

Hemos empleado la técnica descrita por [300], con leves variaciones. Esta consistió, brevemente, en una primera etapa de fijación de las proteínas, sumergiendo el gel inmediatamente después de la corrida electroforética en solución de fijación 1. Repetimos este paso tres veces y cambiamos la solución de fijación 1 por solución de lavado. Repetimos dos veces más este lavado y finalmente equilibramos el gel en solución de fijación 2 durante al menos una hora. Finalmente adicionamos 1,5 % del volumen de la solución de fijación 2 de solución colorante (suspensión en agua bidestilada de Coomassie G-250 2% p/v). Dejamos incubar con agitación al menos durante veinticuatro horas. Eliminamos el fondo mediante lavados con agua bidestilada y conservamos en ácido acético al 1% v/v en agua bidestilada.

Tabla 5.13. Composición de soluciones empleadas en tinción de Coomassie coloidal.

Solución de fijación 1		Solución de lavado		Solución de fijación 2	
Etanol	30 % v/v	Ac. fosfórico	2% v/v	Etanol	18 % v/v
Ác. Fosfórico	2% v/v			Sulfato de amonio	15 % p/v
				Ac. fosfórico	2 % p/v

Digitalización de las imágenes

Las imágenes de los geles fueron digitalizadas con la ayuda de un scanner de oficina, Samsung® L-DE 50. La captura de imágenes en este tipo de adquirentes de imágenes es del tipo reflectivas. Las imágenes fueron adquiridas en escala de grises, formato de archivo tif, con una resolución mínima de 150 puntos por pulgada (dpi) y profundidad de imagen (escala de grises) de 16 bit. Estos son los requisitos recomendados por los fabricantes del software de análisis de imágenes (Image Master 6.0 Platinum®, GE-Healthcare, ver a continuación).

Análisis de imágenes de geles 2D-PAGE

Determinación y obtención de parámetros cuantitativos asociados a los *spots* proteicos.

Las imágenes digitalizadas de los geles fueron analizadas con fines cuantitativos de expresión mediante el software Image Master, versión 6.0 Platinum® (GE-Healthcare). Siguiendo las indicaciones del fabricante, minimizamos la intervención del usuario para facilitar la objetividad del proceso. Operando de esta manera determinamos y asociamos las posiciones de cada uno de los *spots* correspondientes a la resolución de las cadenas polipeptídicas individuales. Como variable asociada a la abundancia relativa de cada una de los *spots* individuales usamos la variable volumen. Esta consiste en el producto de la intensidad máxima del *spot* por el área en píxeles correspondiente a la zona de la mancha que posee al menos el 70% de la intensidad máxima.

Cada conjunto de imágenes obtenidas desde geles 2D-PAGE equivalentes, de extractos proteicos obtenidos a partir de las mismas condiciones de crecimiento, constituyeron un grupo. Como primer paso, la distribución de las manchas individuales en los geles dentro de cada grupo fueron asociadas entre sí (image matching). A continuación se asociaron entre ellas imágenes de referencia de cada grupo para los pares de geles 2D-PAGE obtenidos desde bacterias incubadas en distintas condiciones de crecimiento (eg., igual tipo de extracto proteico pero crecimiento neutro vs moderadamente ácido).

Los valores de variable volumen para los *spots* individuales de cada uno de los geles dentro de cada grupo conforman el conjunto de valores a emplear en el análisis estadístico comparativo.

Análisis estadístico comparativo

El estudio estadístico comparativo de los *spots* en las imágenes digitalizadas de los geles 2D-PAGE ha sido objeto de intenso debate en los últimos años [227-229]. Las pruebas estadísticas paramétricas y en particular aquellas del tipo test T son las más ampliamente difundidas [228]. Uno de los requisitos fundamentales de este tipo de técnicas estadísticas es la distribución normal o paramétrica de la variable de análisis. Para cumplir con este requisito, la variable volumen debe ser previamente transformada. En aquellos casos donde la dispersión de las variables crece directamente proporcional al valor medio de las variables, la transformación logarítmica resulta útil para la parametrización de la variable original. La variable volumen pareciera seguir este comportamiento, de acuerdo a lo sugerido por Hunt y colaboradores [229].

Siguiendo estos criterios se transformó logarítmicamente la variable volumen de los *spots* individuales. Se tomaron en cuenta exclusivamente aquellas manchas detectadas por el programa en la totalidad de los geles de ambos grupos de los pares en comparación: crecimiento neutro vs moderadamente ácido. Aquellas manchas que no cumplían con este requisito fueron descartadas del análisis estadístico.

Una vez cumplimentada la transformación logarítmica de todas las manchas, se efectuó la sumatoria de los valores correspondientes a las manchas individuales de cada gel. A partir de esta sumatoria, cada variable transformada individual fue corregida por diferencias en los valores totales para cada uno de los geles. La variable volumen normalizada y corregida, será la empleada en nuestro análisis estadístico (Vcorr).

A continuación se efectuaron análisis estadísticos mediante el empleo conjunto de los programas Statistica® versión 7.0 y Excel® versión 2003. En primer lugar, buscamos confirmar el comportamiento “normal” de la distribución de la variable Vcorr. Para esto realizamos una representación gráfica de la distribución de frecuencias de manera conjunta de los valores de Vcorr para cada grupo. En paralelo, representamos gráficamente el comportamiento de la variable “normal” esperada vs los valores observados.

Las diferencias en los valores de la variable Vcorr evaluaron mediante la prueba T de Student entre grupos de una misma tanda de 2D-PAGE y distintas condiciones de cultivo inicial. Consideramos como diferencias estadísticamente significativas aquellas con un $\alpha < 0,05$. Como criterio de definición de diferencias con importancia biológica solamente tomamos aquellas que etuvieran al menos una duplicación del valor medio de la variable volumen original a expensas del cultivo en un medio de diferente pH. Siguiendo los criterios recomendados por Hunt y col. [229], efectuamos una prueba de poder sobre aquellos resultados con significación estadística y biológica. El valor de corte en el Poder (P) empleado fue $P > 80\%$. Aquellas manchas cuyas diferencias en los valores de Vcorr entre grupos cumplían simultáneamente con todos estos requisitos anteriores fueron consideradas “diferencias de expresión proteica relativa”.

Por último, aquellos *spots* indetectables en todos los geles de una condición de crecimiento pero presentes en todos los geles de la otra condición de crecimiento fueron catalogadas como diferencias absolutas de expresión proteica.

Identificación de proteínas

Escisión y procesamiento de bandas y spots de los geles

Con el fin de realizar un análisis de identidad de las proteínas que conforman las bandas ó manchas individuales, se empleó la técnica de “huella peptídica” (PMF). Este está basado en el análisis por espectrometría de masas de los péptidos provenientes de digestiones con enzimas conocidas de las manchas de los geles. El protocolo seguido es el sugerido por Grove y colaboradores [301], con algunas modificaciones de acuerdo a lo sugerido por el análisis de Weistmeier y colaboradores [302]. Esquemáticamente, el protocolo de tratamiento consistió en escindir la porción del gel a identificar, de un área cercana al mm^2 y depositarlo en una microplaca de 96 posiciones. Se lavó alternativamente la porción del gel con agua bidestilada y acetonitrilo de calidad HPLC, en tres oportunidades. Luego del último lavado con acetonitrilo, se dejó secar completamente al aire la fracción del gel y se procedió a rehidratar y reducir los residuos de cisteínas. Para esto se incubó durante 30 minutos a

56°C en presencia de una solución 5 mM de DTT en Bicarbonato de amonio 25 mM. Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el exceso de líquido y se repitieron los tres pasos de lavado con agua bidestilada y acetonitrilo. Al finalizar el último lavado con acetonitrilo, se volvió a secar completamente la porción de gel, al aire. El paso siguiente comprendió la alquilación de las cisteínas reducidas, incubando 15 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente, con una solución 55 mM de Iodoacetamida en Bicarbonato de amonio 25 mM. Repetimos luego los lavados con agua bidestilada y acetonitrilo y llevamos a sequedad al aire.

Una vez finalizado el proceso de reducción y alquilación, se procedió a la digestión con Tripsina porcina comercial, marca Promega®. Para ello se rehidrataron en heladera (para minimizar la autólisis enzimática antes de ingresar al gel) con pequeños volúmenes de una suspensión 20 µg/ml de la enzima en bicarbonato de amonio 25 mM. Una vez rehidratada completamente la porción del gel, se retiró el exceso de solución y se cubrió con bicarbonato de amonio 25 mM. Se incubó ON a 37°C, en estufa. Finalizada esta incubación, el líquido que acompañó a los fragmentos de gel, conteniendo el digesto peptídico, fue tomado con ayuda de una micropipeta automática y analizado por espectrometría de masas UV-MALDI Tof/Tof.

Análisis de los digestos por espectrometría de masas UV-MALDI Tof/Tof

Los digestos peptídicos obtenidos en el paso anterior fueron analizados por medio de espectrometría de masas UV-MALDI Tof/Tof. Para ello se siguió fundamentalmente la metodología descrita por Gobom y colaboradores [303], con las adaptaciones requeridas por el empleo de soportes de muestra pre-estructurados, del tipo Anchor Chip® (Bruker Daltonics) [304].

Brevemente, se tomó un volumen de digesto peptídico y mezcló con un volumen de suspensión de matriz. Esta consistió en una suspensión 0.4 g/l de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (HCCA) en una mezcla de partes iguales de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5 % v/v y acetonitrilo (ACN). Se depositaron 0,5 µl de la mezcla de digesto con la suspensión de matriz sobre el soporte (Anchor Chip 400®, Bruker Daltonics) y se dejaron evaporar al aire. Una vez seco se introdujo en un espectrómetro de masas UV-MALDI Tof/Tof, modelo Ultraflex II® de Bruker Daltonics. Algunos parámetros importantes empleados en la obtención de los espectros de masa de los péptidos originales (MS) fueron: modo reflectrón, positivo, con empleo de algoritmo HPC; eliminación de iones con $M/Z < 800$ Da/Z⁺ (por deflexión); caída de potencial en la fuente desde 25 kV hasta 21,6 kV; gradiente de potencial del reflector desde 26,3 kV hasta 13,7 kV; foco del láser en 30; repetición de disparos del láser en 100Hz con ciclos de 200 disparos; ganancia del detector en 100 mV; intensidad del láser variable de acuerdo a la muestra, en torno al 40% del máximo; calibración externa con mezcla de péptidos patrón e interna con péptidos conocidos de la muestra (autólisis de tripsina).

En algunos casos se efectuó la fragmentación de péptidos seleccionados (generados a expensas del láser incidente, ISD), mediante la técnica PSD (post-source-decay), posible gracias a la presencia de la unidad LIFT en los modelos Ultraflex® Tof/Tof (Bruker Daltonics) [305-306]. Los espectros generados de esta manera son del tipo de los denominados espectros de fragmentación MS/MS. En este caso, los parámetros usados en líneas generales fueron: modo LIFT, positivo; sin deflexión; caída de potencial en la fuente desde 8 kV hasta 7,2 kV; caída de potencial en la unidad

LIFT desde 19 kV hasta 3,3 kV; límites de potencial del reflector entre 29,5 kV y 13,8 kV; foco del láser en 30; repetición de disparos del láser en 200 Hz, con ciclos de 100 disparos; intervalo de M/Z de selección de 0,5% del ión padre; intensidad del láser variable de acuerdo a la muestra, en torno al 60% del máximo; la calibración externa fue realizada por fragmentación de péptidos control y la interna con el espectro del ión padre.

La interface de control de los parámetros anteriores en el espectrómetro y la operación del mismo fue realizada por intermedio del software FlexControl® versión 3.0.

La asignación de valores de la relación masa/carga monoisotópicos a cada pico correspondiente a un péptido o fragmentos de este fue realizada por intermedio del programa FlexAnalysis® versión 3.0, empleando el algoritmo SNAP [307]. En líneas generales, se usó frecuentemente un punto de corte de la relación señal a ruido (S/N) entre 1,7 y 3,0, en particular para los espectros MS; se efectuó substracción de líneas de base con el algoritmo TopHat; se usó además un segundo nivel de corte para la calidad de los picos entre 10 (MS) y 30 (MS/MS). Los posibles picos espectrales (MS) correspondientes a péptidos provenientes de contaminaciones (p. ej., keratinas), fueron descartados de acuerdo a lo señalado en un estudio de relevamiento sistemático de las contaminaciones más frecuentes en este tipo de ensayos [308].

Identificación de proteínas a partir de espectros MS y MS/MS

Los espectros de masas de péptidos y productos de su fragmentación fueron analizados con el programa Biotoools® versión 3.1. Este programa actúa como interface entre los espectros provenientes del software Flexanalysis y el programa MASCOT® (Matrix Biosciences) [309]. Este último es un programa que permite la identificación de proteínas basada en la técnica de huella peptídica (PMF) [310]. La técnica consistió brevemente en comparar los espectros de masa experimentales con los obtenibles teóricamente en una digestión *in silico* de las proteínas de una base de datos. El algoritmo estadístico empleado por este programa es una modificación del MOWSE original (molecular weight search) [311].

Los parámetros generales empleados en la identificación a partir de espectros MS fueron: picos mono-isotópicos; error entre +/- 50 y 200 ppm; máximo de una falla en clivaje de tripsina; carbamidometilación de cisteínas como modificación fija; base de datos de NCBI, en el grupo de las eubacterias. La presencia de modificaciones post-traduccionales distintas de las generadas experimentalmente ó altamente probables (carbamidometilación y oxidación de metioninas, respectivamente), fue evaluada con ayuda del programa Finmod (<http://expasy.org/tools/findmod/findmod-doc.html>). El programa MASCOT® nos permitió además la comparación estadística de espectros de fragmentación peptídica (MS/MS) experimentales con los teóricos, asignando un valor de correspondencia entre ellos. En caso de disponer espectros MS de un digesto tríptico y MS/MS de algunos de sus péptidos, la evaluación conjunta de ambos otorgó en la mayor parte de los casos resultados de identificación con mayor relevancia estadística. Los parámetros usados en este caso fueron iguales a los anteriores, adicionando la contemplación de un posible error en los espectros MS/MS de entre 0,5 y 1Da.

Hemos tomado como identificaciones con significación estadística aquellas cuyos espectros MS, MS/MS o combinaciones de ambos permitían una asignación con un error de tipo I de $\alpha < 0.05$, de acuerdo al programa MASCOT®.

Predicción de localización de proteínas

Existen varios algoritmos de predicción del posible destino final de proteínas de acuerdo a las secuencias anotadas [312]. Dentro de ellos, uno de libre acceso cuyo uso está bastante extendido es el Psortb, versión 3,0 [313]. Posee algunas limitaciones como la dificultad de predecir localización definitiva para proteínas con destino final múltiple (ej, integral de membrana interna con dominio periplásmico) ó detección de presencia de motivos lipoprotéicos. Sin embargo, dentro de las versiones anteriores, ha sido focalizado al estudio de bacterias gram negativas y prioriza además la especificidad sobre la sensibilidad de las detecciones. Mediante el empleo de este programa de predicción hemos asignado localización final de proteínas, a partir de la secuencia anotada del genoma de la cepa *B. bronchiseptica* RB50 [98].

Extracción y análisis de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos

Extracción de LPS

La técnica de extracción y purificación de LPS empleada ha sido la descrita por Valverde y colaboradores [314]. Brevemente, consistió en una centrifugación de los cultivos bacterianos una vez que estos han alcanzado las condiciones deseadas, durante 15 min a 10.000 x g, descartando el sobrenadante. A continuación, se lavaron las bacterias dos veces con agua destilada y se resuspendieron suavemente en una mezcla de ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA, agente liberador de LPS por quelación y secuestro de cationes divalentes) y trietilenamina (TEA, agente dispersante de los LPS liberados). Incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente, con agitación moderada y centrifugamos 15 min a 10.000 x g. Retiramos el sobrenadante, descartamos el centrifugado celular y tratamos al sobrenadante con una resuspensión de la resina Polimixina B (Affi-Prep Polymyxin®; Bio-Rad) en 1.0 mM EDTA, 0.1 M HEPES, pH 7.5. Incubamos con agitación moderada durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos 2 min a 10.000 x g, descartando el sobrenadante. Lavamos el pellet de resina con solución de lavado (KH₂PO₄ 100 mM y NaCl 150 mM, pH 7.0), en dos oportunidades. Centrifugamos 2 min a 10.000 x g, descartamos el sobrenadante y adicionamos buffer Laemmli de muestra. Calentamos a baño maria durante 10 min., incubamos en baño de sonicación durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos 2 min a 10.000 x g. El sobrenadante así obtenido contenía los LPS extraídos y purificados.

Resolución electroforética de los LPS

La metodología de resolución de los LPS en sus distintas fracciones consistió en una electroforésis monodimensional en geles desnaturalizantes SDS-PAGE, de manera similar a la descrita para proteínas. La concentración de poliacrilamida en los geles empleada fue del 15 % p/v, con un espesor de gel 0,75 mm, en el sistema Miniprotean II® (BioRad). Los extractos de LPS fueron calentados en baño de agua hirviendo durante 5 minutos y sometidos a sonicación en baño durante 15 minutos previamente a su siembra. La electroforésis fue realizada a potencial constante de 100 V, durante el

tiempo necesario para que el frente de corrida (tomando como referencia la migración del colorante azul de bromofenol de la muestra) arribase al extremo inferior del gel.

La metodología de tinción de LPS empleada ha sido la descrita por Valeverde y colaboradores [315]. Brevemente, esta involucró una primera etapa de fijación de los LPS, durante al menos 4 h en solución fijadora (mezcla metanol: agua: ácido acético, 40:55:5). A continuación se retira la solución fijadora, se lava con agua bidestilada y se incuba 10 minutos en solución de oxidación (ácidos peryódico al 0,7%p/v en agua bidestilada). Posteriormente se lava repetidamente con agua bidestilada para eliminar restos del agente oxidante y se incuba durante 10 min con solución de nitrato de plata (solución comercial de BioRad, diluida al 10%v/v en agua bidestilada). Finalizada esta incubación se lava el gel con abundante agua bidestilada y se revela con solución desarrolladora comercial (Silver stain Developer®, BioRad, 1,5%p/v en agua bidestilada). Una vez arribado al punto final de la tinción se interrumpe el revelado con abundante agua, seguida de ácido acético al 5%v/v en agua bidestilada.

Construcción, expresión y purificación de proteínas recombinantes

Diseño de cebadores específicos y condiciones de amplificación

Con el fin de amplificar la secuencia génica que codifica la proteína BB4918 ó Bacterioferritina en *B. bronchiseptica*, empleamos como referencia la presente en el genoma anotado de la cepa *B. bronchiseptica* RB50 [98]. Mediante el empleo del programa de libre acceso Primer 3 [316-317], diseñamos cebadores específicos para la amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [318]. Sobre el extremo 5' del cebador *BfrF* introdujimos una secuencia terminal CACC, necesaria para el direccionamiento de la secuencia amplificada durante el proceso de clonado (ver a continuación). Para facilitar el proceso de selección de cebadores, incorporamos a la secuencia problema alrededor de 200 pares de bases, localizadas en el genoma en el extremo 3' del ORF correspondiente. Los cebadores diseñados fueron: *bfrF* 5'caccatgaaaggcgataaaacc3', *bfrR* 5'acaagtactgtgcgccaac3'. El producto de amplificación de acuerdo a la secuencia empleada tendría un tamaño de 627 bp. Como molde de ADN a amplificar usamos el sobrenadante obtenido de una lisis bacteriana por *shock* térmico.

La amplificación del segmento de ADN buscado fue realizada mediante el empleo de la enzima polimerasa Pfx Platinum® (Invitrogen). El medio de reacción, de volumen final de 20 µl, estaba compuesto por una dilución, de acuerdo a recomendaciones del fabricante, de Buffer de Reacción y Solución Enhancer (Invitrogen). Las concentraciones de cada uno de los cebadores fueron de 0,5cM y una concentración final de una mezcla de los cuatro nucleótidos trifosfato de 0,2mM. Finalmente, se realizó el agregado de Sulfato de magnesio 5mM, concentración acorde a los requerimientos de especificidad de la enzima.

La amplificación por técnica de PCR fue realizada en un equipo iCycler® (BioRad), de acuerdo a los parámetros de ciclado mencionados en la Tabla 5.14:

Tabla 5.14 Protocolo empleado en amplificación de la secuencia nucleotídica *bfr*

Número de ciclos	Paso	Duración/temperatura
1	Desnaturalización	2min/94°C
35	Desnaturalización	30seg/94°C
	Renaturalización	10seg/50°C
	Elongación	40seg/68°C
1	Elongación	1min/68°C

Una vez cumplimentado el paso de amplificación, los productos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa (1,0%p/v), en buffer de electroforesis TBE 0,5X (Tris 5,4g/L; ácido bórico 2,75 g/L; EDTA disódico 1mM; pH=8,0), a una tensión constante de 100V, durante 20 min. El tamaño del amplicón obtenido fue determinado por comparación del perfil de resolución electroforética del producto de digestión de una muestra de ADN de fago lambda, digerida con la enzima de restricción EcoRI (origen comercial, Invitrogen).

Clonado de la secuencia amplificada

La secuencia amplificada fue clonada mediante el sistema de clonado y expresión pENTR/SD/D-TOPO® (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El plásmido recombinante fue introducido mediante electroporación en la cepa electrocompetente de *Escherichia coli* Top10® (Invitrogen). La selección de clones recombinantes fue realizada mediante selección positiva por su resistencia al antibiótico Kanamicina (25µg/ml, Km^r). Como prueba confirmatoria se realizó una amplificación por técnica de PCR con cebadores específicos para la secuencia amplificada inicialmente. Se buscó presencia de amplicón de tamaño correspondiente en cepas Km^r. Sobre estas últimas cepas se realizó una extracción y purificación de plásmidos, de acuerdo a la técnica de minipreparación plasmídica. El inserto fue liberado y transferido al vector de expresión Gateway pDEST17® (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este último plásmido, pDEST:BB4918, fue transferido por electroporación [319] a la cepa electrocompetente de *E. coli* Top10®. Se efectuó una selección positiva de clones recombinantes por adopción de resistencia al antibiótico Ampicilina (200 µg/ml en medio sólido LB). La confirmación se realizó mediante la amplificación específica por la técnica de PCR de extracciones de ADN realizadas por lisis osmótica.

Finalmente, aquellas cepas que hayan resultado positivas a las pruebas confirmatorias, fueron conservadas a -20°C en una mezcla en partes iguales de medio LB y glicerina estériles.

Tabla 5.15. Composición medio Luria Bertani (LB)

Reactivo	Concentración
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Glucosa	1g/L
NaCl	85 mM

Nota: el medio sólido LB se construyó adicionando a este medio 12g/L de agarosa, antes de esterilizar por calor húmedo en autoclave, 15 min a 1 atm de sobrepresión.

Purificación del plásmido

La técnica de purificación del vector de expresión construido en la sección anterior es la de mini-preparación plasmídica por lisis alcalina [320], con leves modificaciones. La principal de estas modificaciones consistió en purificar el plásmido por intermedio de su adhesión a resinas de sílica, siguiendo la técnica descrita por Boyle y Lew [321]. El plásmido purificado fue finalmente lavado con etanol 70% v/v y resuspendido en agua bidestilada estéril. Con el fin de minimizar la presencia de ribonucleótidos se trató con ribonucleótidasa A una hora a 37°C (1 mg/ml, Invitrogen). La cuantificación de ADN plasmídico purificado fue estimada por espectrofotometría [320], mediante el empleo del sistema Nanodrop® ND-1000. Las concentraciones de ADN fueron estimadas considerando que una $DO_{260nm}=1$ corresponde a las siguientes concentraciones: 50 µg/ml de ADN de cadena doble, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla o ARN, y 20 µg/ml de oligonucleótidos. La relación DO_{260nm} / DO_{280nm} fue empleada como criterio de pureza de la preparación. Valores en esta relación inferiores a 1,8 fueron considerados indicadores de contaminación por proteínas o fenol.

El análisis cualitativo de las muestras de ADN y la separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1,0% p/v) empleando buffer TBE como buffer de corrida. La electroforesis fue realizada a tensión constante de 100V. Como solución de siembra de la muestra plasmídica se utilizó sacarosa 40% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v en una relación 1:5 respecto a la solución de ADN en agua por cada 1 µl solución. La visualización del ADN sobre los geles de agarosa se realizó por adición de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Este compuesto permite la visualización del ADN por transiluminación con luz ultravioleta, al adquirir actividad de fluoróforo cuando se intercala en la doble hebra de ADN. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía digital de los geles con una cámara Kodak modelo DC 290 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

Expresión de la proteína recombinante rBB4918

El plásmido pDEST17:BB4918 posee el inserto correspondiente a la secuencia nucleotídica de la proteína BB4918, acompañada de 6 codones correspondientes al aminoácido Histidina, inmediatamente río arriba. La expresión de la proteína recombinante final (rBB4918) produjo la proteína BB4918, fusionada en el extremo N terminal con seis histidinas, para facilitar su purificación. A su vez, la expresión de la proteína recombinante rBB4918 se encuentra dirigida por una región promotora bajo el dominio del operador *lac*. El plásmido purificado a partir de la cepa *E. coli* Top10® fue introducido por electroporación en la cepa de expresión *E. coli* BL21 DE3® (Invitrogen).

La confirmación definitiva de la presencia de inserto adecuado y funcional de la proteína recombinante rBB4918 en clones de la cepa BL21 DE3 pDEST17:BB4918 se realizó como se describe a continuación. Se partió de un cultivo stock de la cepa conservado a -20°C, inoculando con este un cultivo semilla de medio líquido de 5 ml de volumen. Este cultivo fue incubado con agitación, en aerobiosis a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,800-1,000 (fase exponencial). Alcanzado este valor de biomasa se indujo la expresión de proteína recombinante rBB4918 merced a la adición del análogo estructural de la β-tiogalactosa, el Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG), a una concentración final 1µM. Se incubó en

iguales condiciones durante una hora y media. Finalizado este período de tiempo, se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min una alícuota de 1 ml del cultivo. El centrifugado fue resuspendido en 50 µl de tampón de muestra Laemmli. Se realizó una extracción de proteínas totales por medio de una lisis en baño de agua hirviendo, seguida de ultrasonido. Este extracto fue sembrado y resuelto en gel de poliacrilamida al 12,5% p/v, según fue detallado en la sección correspondiente. Finalmente, se buscó observar la presencia de una banda mayoritaria de tamaño molecular coincidente con el esperado para la proteína recombinante. Se confirmó la naturaleza de la banda mediante espectrometría de masas, según lo detallado en la sección correspondiente.

Aquellas cepas conservadas a -20°C que demostraron capacidad de expresión de la proteína rBB4918 en base al párrafo anterior fueron empleadas en la expresión y purificación de la proteína. Para ello, se partió de un cultivo *stock* de la cepa conservado a -20°C, inoculando con este un cultivo semilla de medio líquido de 5 ml de volumen. Este cultivo fue incubado con agitación, en aerobiosis a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,800-1,000. Una vez culminado este período de incubación, se realizó una dilución 1/100 del cultivo semilla en 250 ml de medio líquido LB, contenidos en un recipiente del tipo Erlenmeyer de un litro de capacidad. Este cultivo fue incubado en iguales condiciones hasta alcanzar nuevamente una densidad óptica a 600nm de 0,800 a 1,000. Una vez arribado a este valor de biomasa se indujo la expresión de proteína recombinante rBB4918 merced a la adición del análogo estructural de IPTG a una concentración final 1µM. Se continuó con la incubación durante una hora y media, tras lo cual se centrifugó la totalidad del cultivo a 10.000 x g, durante 15 min a 4°C. El centrifugado bacteriano fue resuspendido en resuspendió en buffer de lisis, con una relación de 4 ml de buffer de lisis cada 100 ml de medio de cultivo original.

Tabla 5.16. Composición buffer de lisis

Reactivo	Concentración
Urea	8 M
Fosfato dibásico de sodio	20 mM
NaCl	500 mM
pH final= 7,80	

Purificación de la proteína recombinante rBB4918

La resuspensión bacteriana en buffer de lisis obtenida en la sección anterior, fue sometida un proceso de ruptura física por ultrasonido, con sonicador de punta de 1/8 de pulgada (150 Digital Sonifier®, Branson) bajo enfriamiento con mezcla de agua hielo. Se realizaron series de seis pulsos de 6 watts de potencia, de un minuto y medio de duración con treinta segundos de descanso, hasta clarificación apreciable y sostenida de la resuspensión bacteriana. Las células intactas fueron separadas por centrifugación durante 10 min a 10.000 x g de aceleración y 4°C de temperatura. A partir del lisado libre de células se procedió a la purificación de la proteína rBB4918. Como se detalló anteriormente, esta posee en su extremo N terminal un segmento de 6 histidinas, adicionado durante el proceso de clonado. La presencia de este segmento posibilita la realización de un proceso de purificación por cromatografía de afinidad. Para esto, utilizamos la resina Ni-NTA (Invitrogen), como fase sólida, realizando eluciones sucesivas bajo condiciones desnaturizantes (8Murea, 20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl) con cambios discontinuos en el pH de la fase móvil (rango

utilizado 7.8 - 4). Las fracciones recuperadas en cada paso de elución fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE. Aquellas fracciones conteniendo bandas en el gel SDS-PAGE correspondientes a la proteína buscada (confirmadas por espectrometría de masas), con un mínimo de proteínas acompañantes, fueron dializadas a 4 °C en buffer fosfato PBS, con el fin de remover la urea. La proteína dializada resultó finalmente resuspendida en buffer PBS y fue cuantificada mediante la variante en microplaca de la técnica de Bradford. La purificación proteica se conservó a – 20°C hasta el momento de su uso.

Ensayos de infección en ratones y obtención de sueros policlonales

Cinética de infección a corto plazo en el modelo murino

Para realizar estos ensayos se emplearon grupos de ratones Balb/c hembras (Biol SAIC) de 3 a 4 semanas de edad. Los inóculos bacterianos utilizados consistieron en números variables de bacterias (entre 5×10^5 y 5×10^7 UFC, según el caso) resuspendidas en 50 µl de solución salina PBS. Estas bacterias provenían de cultivos en fase exponencial tardía realizados en medio SS y SS modificado, con un pH de 7,20 o 5,50, a 37°C, en condiciones de aerobiosis y a 37°C. La infección se realizó por inoculación intranasal de la resuspensión bacteriana con pipeta, en ratones levemente anestesiados por vapores de éter etílico. En la confección del inóculo se utilizó la relación $DO_{650nm} = 1 = 3 \times 10^9$ bacterias/ml, posteriormente evaluados mediante siembras de diluciones seriadas del inóculo en placas conteniendo el medio BGAS, luego de 48 h de incubación a 37 °C y recuento de bacterias viables.

A diferentes tiempos post-inoculación los ratones infectados fueron sacrificados mediante dislocación cervical y sus pulmones fueron extraídos en esterilidad y homogeneizados (ProScientific INC 200) en 1 ml de PBS estéril. Diluciones seriadas de estos homogenatos fueron plaqueadas en medio BGAS por duplicado y las bacterias viables recuperadas a las 48 horas de incubación a 37°C fueron contadas, determinándose a partir de estos valores los recuentos de bacterias viables por pulmón en cada ratón.

Obtención de sueros policlonales específicos

Con el fin de validar el resultado obtenido por la estrategia de proteómica de expresión diferencial para el caso de la Bacterioferritina (BB4918), procedimos a a realizar una estimación semi-cuantitativa independiente de esta proteína. Para ello, en primer lugar, sintetizamos anticuerpos policlonales reactivos específicos. Estos fueron obtenidos por inmunización de ratones C56/Bl7 según se detalla a continuación.

Con una vacuna preparada usando como inmunógeno 3 µg de rBB4918 purificada e hidróxido de aluminio como adyuvante, inoculamos por vía intraperitoneal 3 ratones. A continuación, se realizaron dos inoculaciones más por la misma vía sobre estos ratones, espaciadas por 14 días entre ellas y respecto a la primera. Finalmente, los ratones fueron eutanizados por dislocación 15 días después de la última dosis y se procedió a su sangría a blanco. La sangre proveniente de estos ratones se coaguló por incubación a 37°C durante una hora y el suero se separó por centrifugación a 3000G durante 15 minutos. El suero obtenido fue probado en cuanto a su especificidad mediante la técnica de Inmunoblot que se describe a continuación, empleando como control positivo a la proteína recombinante rBB4918.

Inmunoblot de proteínas

Los extractos proteicos a ser estudiados por la metodología de inmunoblot (Western blot) fueron previamente resueltos por electroforesis en una dimensión según se detalla en la sección correspondiente. Las cantidades y naturaleza de los extractos empleados se encuentran detallados en la figura correspondiente. Se empleó a modo de control positivo la siembra de 0,1 μg de la proteína recombinante purificada rBB4918. Una vez finalizada la electroforesis, los geles obtenidos fueron equilibrados en solución de transferencia durante 15 minutos. Transcurrido este período de tiempo, se procedió a la transferencia de las proteínas del gel, de manera activa a una membrana de bifluoruro de polivinildieno (PVDF) (Inmobilon[®], Millipore) mediante la aplicación de potencial eléctrico. Esto fue realizado en un equipo Mini Trans-Blot transfer cell[®] (Biorad), durante una hora a 100V, en baño de hielo, empleando como medio al buffer de transferencia nombrado anteriormente. Finalizado el paso de transferencia, se verificó la eficacia de la misma sumergiendo la membrana en solución de Rojo Ponceau al 0,5%p/v en ácido acético al 5%v/v. El colorante fue eliminado por lavado con agua bidestilada y finalmente se procedió al bloqueo de sitios de unión inespecífica de proteínas sobre la membrana por incubación de esta durante una hora a temperatura ambiente en una solución al 5%p/v de leche descremada en polvo San Regim[®] en buffer TBS, con agitación orbital. A continuación se eliminó el bloqueante y se incubó ON a 8°C con una dilución 1/250 del suero específico policlonal anti-rBB4918 en TBS-leche al 5%p/v, con agitación suave. Finalizado este primer período de incubación, recuperamos la dilución del suero anti-rBB4918 y lavamos la membrana en seis oportunidades con TBS-leche al 5%p/v. Procedimos luego a la incubación con una dilución 1/1000 de suero específico policlonal anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) en TBS-leche 5%p/v, durante dos horas y media a temperatura ambiente, con agitación suave. Transcurrida esta segunda incubación con antisuero, recuperamos la dilución de antisuero conjugado y lavamos la membrana tres veces con TBS y dos veces con solución PA.

A continuación procedimos al revelado de la membrana transferida. Para ello, depositamos sobre la membrana una solución de sustrato de la fosfatasa alcalina, consistente en 4,4 μl de NBT (Cloruro de Azul Nitro-tetrazolio) y 3,3 μl de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indoilfosfato de p-toluidinio) en 1ml de buffer PA. Dejamos desarrollar en oscuridad hasta punto final de depósito de precipitado coloreado en las posiciones de detección específica de proteínas (minimizando el ruido de fondo) y detuvimos la reacción con agua bidestilada. Dejamos secar al aire y finalmente se obtuvimos imágenes digitales de las membranas reveladas, con un scanner de escritorio.

Tabla 5.17. Soluciones empleadas en la detección semicuantitativa de rBfr mediante la técnica de Western-blot.

Buffer de transferencia		Tampón TBS		Tampón PA	
Tris	15,1 g/L	Tris	6,0 g/L	Tris	50 mM
Glicina	57,6 g/L	NaCl	8,8 g/L	NaCl	50 mM
				MgCl ₂	2,5 mM

Referencias bibliográficas

1. WHO, FAO, and OIE, *Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases*. 2004: Ginebra, Swiza. p. 62.
2. Woolfrey, B.F. and J.A. Moody, *Human infections associated with Bordetella bronchiseptica*. Clin Microbiol Rev, 1991. **4**(3): p. 243-55.
3. Dworkin, M.S., et al., *Bordetella bronchiseptica infection in human immunodeficiency virus-infected patients*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(5): p. 1095-9.
4. Ner, Z., et al., *Bordetella bronchiseptica infection in pediatric lung transplant recipients*. Pediatr Transplant, 2003. **7**(5): p. 413-7.
5. Carter, G.R. and D.J. Wise, *Host parasite relationships*, in *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*, G.R. Carter and D.J. Wise, Editors. 2004, Iowa state press, Blackwell publishing company. p. 65-75.
6. Shakespeare, M., *Introduction to zoonoses*, in *Zoonoses*, M. Shakespeare, Editor. 2009, Pharmaceutical press. p. 1-25.
7. Cohen, M.L., *Resurgent and emergent disease in a changing world*. Br Med Bull, 1998. **54**(3): p. 523-32.
8. Blancou, J., et al., *Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control*. Vet Res, 2005. **36**(3): p. 507-22.
9. Williamson, E.D., A.J. Simpson, and R.W. Titball, *Plague vaccines*, in *Vaccines*, S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, and P.A. Offit, Editors. 2008, Elsevier.
10. Schwartz, M., *Dr. Jekyll and Mr. Hyde: a short history of anthrax*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 347-55.
11. Hugh-Jones, M.E., W.T. Hubbert, and H.V. Hagstad, *Principles of zoonoses recognition*, in *Zoonoses. Control, recognition and prevention* M.E. Hugh-Jones, W.T. Hubbert, and H.V. Hagstad, Editors. 2000, Iowa State University Press: Ames, Iowa. p. 23-44.
12. WHO. *Zoonotic Infections*. [cited 2010; Available from: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/zoonotic/en/index.html].
13. Meslin, F.X., *Public health impact of zoonoses and international approaches for their detection and containment*. Vet Ital, 2008. **44**(4): p. 583-90.
14. Hugh-Jones, M.E., W.T. Hubbert, and H.V. Hagstad, *Development of control and prevention strategies*, in *Zoonoses. Recognition, control and prevention*, M.E. Hugh-Jones, W.T. Hubbert, and H.V. Hagstad, Editors. 2000, Iowa state press, Blackwell publishing. p. 9-11.
15. Mattoo, S. and J.D. Cherry, *Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 326-82.
16. Goldsmid, J.M., *Zoonotic infections – an overview*, in *Primer of tropical medicine*, J.M. Goldsmid and P.A. Leggat, Editors. 2005, Australian College of Tropical Medicine.
17. Goodnow, R.A., *Biology of Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev, 1980. **44**(4): p. 722-38.
18. Ferry, N., *A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper*. Am. Vet. Rev., 1910. **37**: p. 499-504.

19. Mochizuki, M., et al., *Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs*. J Vet Med Sci, 2008. **70**(6): p. 563-9.
20. Edinboro, C.H., M.P. Ward, and L.T. Glickman, *A placebo-controlled trial of two intranasal vaccines to prevent tracheobronchitis (kennel cough) in dogs entering a humane shelter*. Prev Vet Med, 2004. **62**(2): p. 89-99.
21. Bemis, D.A., H.A. Greisen, and M.J. Appel, *Pathogenesis of canine bordetellosis*. J Infect Dis, 1977. **135**(5): p. 753-62.
22. Egberink, H., et al., *Bordetella bronchiseptica infection in cats. ABCD guidelines on prevention and management*. J Feline Med Surg, 2009. **11**(7): p. 610-4.
23. Jacobs, A.A., et al., *Feline bordetellosis: challenge and vaccine studies*. Vet Rec, 1993. **133**(11): p. 260-3.
24. Donko, T., M. Kovacs, and T. Magyar, *Association of growth performance with atrophic rhinitis and pneumonia detected at slaughter in a conventional pig herd in Hungary*. Acta Vet Hung, 2005. **53**(3): p. 287-98.
25. Backstrom, L., et al., *Effect of atrophic rhinitis on growth rate in Illinois swine herds*. J Am Vet Med Assoc, 1985. **187**(7): p. 712-5.
26. Paisley, L.G., et al., *An epidemiologic and economic study of respiratory diseases in two conventional Danish swine herds. II: Associations between lesions present at slaughter and mean daily gains during specific intervals of the growth period*. Acta Vet Scand, 1993. **34**(4): p. 331-44.
27. Choi, Y.K., S.M. Goyal, and H.S. Joo, *Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs*. Can Vet J, 2003. **44**(9): p. 735-7.
28. Magyar, T. and A.J. Lax, *Atrophic Rhinitis*, in *Polymicrobial Diseases*, K.A. Brodget and J.M. Guthmiller, Editors. 2002, ASM Press.
29. Magyar, T. and A. Lax, *Chapter 10: Atrophic Rhinitis*. Polymicrobial Diseases, ed. K.A. Brogden and J.M. Guthmiller. 2002: ASM Press.
30. Palzer, A., et al., *Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia*. Vet Rec, 2008. **162**(9): p. 267-71.
31. Brockmeier, A.L., P.G. Halbur, and E.L. Thacker, *Porcine Respiratory Disease Complex*, in *Polymicrobial Diseases*, K.A. Brodget and J.M. Guthmiller, Editors. 2002, ASM Press.
32. Brockmeier, S.L., *Prior infection with Bordetella bronchiseptica increases nasal colonization by Haemophilus parasuis in swine*. Vet Microbiol, 2004. **99**(1): p. 75-8.
33. Brockmeier, S.L., et al., *Coinfection of pigs with porcine respiratory coronavirus and Bordetella bronchiseptica*. Vet Microbiol, 2008. **128**(1-2): p. 36-47.
34. Brockmeier, S.L. and K.M. Lager, *Experimental airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Bordetella bronchiseptica*. Vet Microbiol, 2002. **89**(4): p. 267-75.
35. Harvill, E.T., P.A. Cotter, and J.F. Miller, *Pregenomic comparative analysis between bordetella bronchiseptica RB50 and Bordetella pertussis tohama I in murine models of respiratory tract infection*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 6109-18.
36. Cotter, P.A. and J.F. Miller, *BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of Bordetella bronchiseptica in a rabbit model*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3381-90.

37. Yoda, H., et al., *Development of resistance to reinfection of Bordetella bronchiseptica in guinea pigs recovered from natural infection*. Nippon Juigaku Zasshi, 1972. **34**(4): p. 191-6.
38. Brockmeier, S.L., *Early colonization of the rat upper respiratory tract by temperature modulated Bordetella bronchiseptica*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **174**(2): p. 225-9.
39. Irie, Y. and M.H. Yuk, *In vivo colonization profile study of Bordetella bronchiseptica in the nasal cavity*. FEMS Microbiol Lett, 2007. **275**(2): p. 191-8.
40. Gueirard, P., et al., *Bordetella bronchiseptica persists in the nasal cavities of mice and triggers early delivery of dendritic cells in the lymph nodes draining the lower and upper respiratory tract*. Infect Immun, 2003. **71**(7): p. 4137-43.
41. Brooksaler, F. and J.D. Nelson, *Pertussis. A reappraisal and report of 190 confirmed cases*. Am J Dis Child, 1967. **114**(4): p. 389-96.
42. Katzenstein, D.A., L. Ciofalo, and M.C. Jordan, *Bordetella bronchiseptica bacteremia*. West J Med, 1984. **140**(1): p. 96-8.
43. Buggy, B.P., et al., *Bordetella bronchiseptica pneumonia in a patient with chronic lymphocytic leukemia*. South Med J, 1987. **80**(9): p. 1187-9.
44. Papasian, C.J., et al., *Bordetella bronchiseptica bronchitis*. J Clin Microbiol, 1987. **25**(3): p. 575-7.
45. Byrd, L.H., et al., *Bordetella bronchiseptica peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis*. J Clin Microbiol, 1981. **14**(2): p. 232-3.
46. Stoll, D.B., S.A. Murphey, and S.K. Ballas, *Bordetella bronchiseptica infection in stage IV Hodgkin's disease*. Postgrad Med J, 1981. **57**(673): p. 723-4.
47. Ghosh, H.K. and J. Tranter, *Bordetella bronchicanis (bronchiseptica) infection in man: review and a case report*. J Clin Pathol, 1979. **32**(6): p. 546-8.
48. Chang, K.C., et al., *Letter: Posttraumatic purulent meningitis due to Bordetella bronchiseptica*. J Pediatr, 1975. **86**(4): p. 639-40.
49. Snell, J.J.S., *The distribution and identification of non-fermenting bacteria*. Public Health Laboratory Services, Monograph series, 1973. **4**: p. 1-45.
50. Gardner, P., et al., *Nonfermentative gram-negative bacilli of nosocomial interest*. Am J Med, 1970. **48**(6): p. 735-49.
51. Kristensen, K.H. and H. Lautrop, *[A family epidemic caused by the whooping-cough bacterium Bordetella bronchiseptica.]*. Ugeskr Laeger, 1962. **124**: p. 303-8.
52. Dale, A.J.D. and J.E. Geraci, *Mixed cardiac valvular infection: report case and review of literature*. Proceedings of Staff Meeting Mayo Clinic, 1961(36): p. 288-294.
53. Winsser, *A study of Bordetella bronchiseptica*. Proceedings of the Animal Care Panel, 1960(10): p. 87-104.
54. Krepler, P. and H. Flamm, *[Bordetella bronchiseptica as causative agent of human diseases.]*. Wien Klin Wochenschr, 1958. **70**(35): p. 641-4.
55. Chang, S.M., *Pertussis due to Brucella bronchiseptica*. Pediatrics, 1950(6): p. 227-228.
56. Jones, M., *Subacute bacterial endocarditis of nonstreptococcal etiology; a review of the literature of the thirteen-year period 1936-1948 inclusive*. Am Heart J, 1950. **40**(1): p. 106-16.

57. Brown, J.H., *Bacillus bronchisepticus* infection in a child with symptoms of pertussis. Bulletin of Johns Hopkins Hospital, 1926(38): p. 147-153.
58. Ferry, N.S., *Canine distemper*. Proceedings of Wisconsin Veterinary Medical Association, 1917(1917): p. 80-88.
59. McGowan, J.P., *Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats, in which the animals affected presented the symptoms of the disease called "distemper"*. Journal of Pathological Bacteriology, 1911(15): p. 372-430.
60. Lorenzo-Pajuelo, B., et al., *Cavitary pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual Bordetella bronchiseptica variant producing reduced amounts of pertactin and other major antigens*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3146-54.
61. Valencia, M.E., et al., *[Bordetella bronchiseptica pneumonia in patients with HIV]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2004. **22**(8): p. 502-3.
62. Choy, K.W., et al., *Bordetella bronchiseptica respiratory infection in a child after bone marrow transplantation*. Pediatr Infect Dis J, 1999. **18**(5): p. 481-3.
63. Huebner, E.S., et al., *Hospital-acquired Bordetella bronchiseptica infection following hematopoietic stem cell transplantation*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(7): p. 2581-3.
64. Gisel, J.J., L.M. Brumble, and M.M. Johnson, *Bordetella bronchiseptica pneumonia in a kidney-pancreas transplant patient after exposure to recently vaccinated dogs*. Transpl Infect Dis, 2010. **12**(1): p. 73-6.
65. Bauwens, J.E., et al., *Bordetella bronchiseptica pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(9): p. 2474-5.
66. Lo Re, V., 3rd, et al., *Infected branchial cleft cyst due to Bordetella bronchiseptica in an immunocompetent patient*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(11): p. 4210-2.
67. Gueirard, P., et al., *Human Bordetella bronchiseptica infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(8): p. 2002-6.
68. Rath, B.A., et al., *Persistent Bordetella bronchiseptica pneumonia in an immunocompetent infant and genetic comparison of clinical isolates with kennel cough vaccine strains*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(6): p. 905-8.
69. Harris, D.L. and W.P. Switzer, *Nasal and tracheal resistance of swine against reinfection by Bordetella bronchiseptica*. Am J Vet Res, 1969. **30**(7): p. 1161-6.
70. Gopinathan, L., et al., *Different mechanisms of vaccine-induced and infection-induced immunity to Bordetella bronchiseptica*. Microbes Infect, 2007. **9**(4): p. 442-8.
71. Kirimanjeswara, G.S., P.B. Mann, and E.T. Harvill, *Role of antibodies in immunity to Bordetella infections*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1719-24.
72. Koshimizu, K., et al., *Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. VI. Effect of vaccination against nasal establishment of Bordetella bronchiseptica*. Nippon Juigaku Zasshi, 1973. **35**(5): p. 411-8.
73. Stevenson, A. and M. Roberts, *Use of a rationally attenuated Bordetella bronchiseptica as a live mucosal vaccine and vector for heterologous antigens*. Vaccine, 2002. **20**(17-18): p. 2325-35.

74. Iemura, R., et al., *Simultaneous analysis of the nasal shedding kinetics of field and vaccine strains of Bordetella bronchiseptica*. Vet Rec, 2009. **165**(25): p. 747-51.
75. Magyar, T., T. Donko, and F. Kovacs, *Atrophic rhinitis vaccine composition triggers different serological profiles that do not correlate with protection*. Acta Vet Hung, 2008. **56**(1): p. 27-40.
76. Kobisch, M. and A. Pennings, *An evaluation in pigs of Nobi-Vac AR and an experimental atrophic rhinitis vaccine containing P multocida DNT-toxoid and B bronchiseptica*. Vet Rec, 1989. **124**(3): p. 57-61.
77. Kang, M.L., et al., *Chitosan microspheres containing Bordetella bronchiseptica antigens as novel vaccine against atrophic rhinitis in pigs*. J Microbiol Biotechnol, 2008. **18**(6): p. 1179-85.
78. Davis, R., et al., *Comparison of the mucosal immune response in dogs vaccinated with either an intranasal avirulent live culture or a subcutaneous antigen extract vaccine of Bordetella bronchiseptica*. Vet Ther, 2007. **8**(1): p. 32-40.
79. Mann, P., et al., *Use of a genetically defined double mutant strain of Bordetella bronchiseptica lacking adenylate cyclase and type III secretion as a live vaccine*. Infect Immun, 2007. **75**(7): p. 3665-72.
80. Shimizu, T. and H. Ishikawa, *Some characteristics of a urease-negative, temperature-sensitive strain of Bordetella bronchiseptica as a live, attenuated vaccine*. Infect Immun, 1982. **36**(1): p. 198-201.
81. Shimizu, T., *Prophylaxis of Bordetella bronchiseptica infection in guinea pigs by intranasal vaccination with live strain ts-S34*. Infect Immun, 1978. **22**(2): p. 318-21.
82. McArthur, J.D., et al., *An aromatic amino acid auxotrophic mutant of Bordetella bronchiseptica is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **221**(1): p. 7-16.
83. Williams, J., et al., *Studies of the efficacy of a novel intranasal vaccine against feline bordetellosis*. Vet Rec, 2002. **150**(14): p. 439-42.
84. Bey, R.F., et al., *Intranasal vaccination of dogs with liver avirulent Bordetella bronchiseptica: correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis*. Am J Vet Res, 1981. **42**(7): p. 1130-2.
85. Ehser, U., G. Mehlhorn, and H. Mietke, *[The effect of a Bordetella live vaccine on the occurrence and manifestation of atrophic rhinitis suum and the aerogenous infection burden in field strains of the agent]*. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1993. **100**(9): p. 355-9.
86. Gerlach, G., et al., *Evolutionary trends in the genus Bordetella*. Microbes Infect, 2001. **3**(1): p. 61-72.
87. Tuomanen, E.I., et al., *Species specificity of Bordetella adherence to human and animal ciliated respiratory epithelial cells*. Infect Immun, 1983. **42**(2): p. 692-5.
88. Pilione, M.R., et al., *CD11b is required for the resolution of inflammation induced by Bordetella bronchiseptica respiratory infection*. Cell Microbiol, 2006. **8**(5): p. 758-68.
89. Schipper, H., G.F. Krohne, and R. Gross, *Epithelial cell invasion and survival of Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun, 1994. **62**(7): p. 3008-11.

90. Savelkoul, P.H., et al., *Invasion of HeLa cells by Bordetella bronchiseptica*. Microb Pathog, 1993. **14**(2): p. 161-8.
91. Fernandez, J., et al., *Constitutive expression of bvgR-repressed factors is not detrimental to the Bordetella bronchiseptica-host interaction*. Res Microbiol, 2005. **156**(8): p. 843-50.
92. Banemann, A. and R. Gross, *Phase variation affects long-term survival of Bordetella bronchiseptica in professional phagocytes*. Infect Immun, 1997. **65**(8): p. 3469-73.
93. Brockmeier, S.L. and K.B. Register, *Effect of temperature modulation and bvg mutation of Bordetella bronchiseptica on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages*. Vet Microbiol, 2000. **73**(1): p. 1-12.
94. Forde, C.B., R. Parton, and J.G. Coote, *Bioluminescence as a reporter of intracellular survival of Bordetella bronchiseptica in murine phagocytes*. Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3198-207.
95. Jungnitz, H., et al., *A second two-component regulatory system of Bordetella bronchiseptica required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4640-50.
96. Zimna, K., et al., *Role played by the response regulator Ris in Bordetella bronchiseptica resistance to macrophage killing*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **201**(2): p. 177-80.
97. Schneider, B., R. Gross, and A. Haas, *Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of Bordetella pertussis and B. bronchiseptica*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 7039-48.
98. Parkhill, J., et al., *Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet, 2003. **35**(1): p. 32-40.
99. van der Zee, A., et al., *The differentiation of Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship*. Int J Syst Bacteriol, 1996. **46**(3): p. 640-7.
100. van der Zee, A., et al., *Molecular evolution and host adaptation of Bordetella spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences*. J Bacteriol, 1997. **179**(21): p. 6609-17.
101. Diavatopoulos, D.A., et al., *Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of B. bronchiseptica*. PLoS Pathog, 2005. **1**(4): p. e45.
102. Cummings, C.A., et al., *Bordetella species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation*. J Bacteriol, 2004. **186**(5): p. 1484-92.
103. Mazar, J. and P.A. Cotter, *Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion*. Mol Microbiol, 2006. **62**(3): p. 641-54.
104. Nicholson, T.L., S.L. Brockmeier, and C.L. Loving, *Contribution of Bordetella bronchiseptica filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine*. Infect Immun, 2009. **77**(5): p. 2136-46.

105. Mattoo, S., J.F. Miller, and P.A. Cotter, *Role of Bordetella bronchiseptica fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response*. Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 2024-33.
106. Locht, C., M.C. Geoffroy, and G. Renauld, *Common accessory genes for the Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families*. EMBO J, 1992. **11**(9): p. 3175-83.
107. Mattoo, S., et al., *Mechanisms of Bordetella pathogenesis*. Front Biosci, 2001. **6**: p. E168-86.
108. Cummings, C.A., et al., *Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by Bordetella BvgAS*. J Bacteriol, 2006. **188**(5): p. 1775-85.
109. Glaser, P., et al., *Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis*. EMBO J, 1988. **7**(12): p. 3997-4004.
110. Glaser, P., et al., *The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of Bordetella pertussis: cloning and expression in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1988. **2**(1): p. 19-30.
111. Goyard, S., et al., *Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents*. Zentralbl Bakteriol, 1993. **278**(2-3): p. 326-33.
112. Hackett, M., et al., *Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis*. Science, 1994. **266**(5184): p. 433-5.
113. Barry, E.M., et al., *Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, cyaC, for activation*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 720-6.
114. Bouhss, A., et al., *Cooperative phenomena in binding and activation of Bordetella pertussis adenylate cyclase by calmodulin*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1690-4.
115. Ladant, D., et al., *Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of Bordetella pertussis adenylate cyclase*. J Biol Chem, 1989. **264**(7): p. 4015-20.
116. Rose, T., et al., *Interaction of calcium with Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes*. J Biol Chem, 1995. **270**(44): p. 26370-6.
117. Otero, A.S., et al., *Membrane depolarization prevents cell invasion by Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin*. J Biol Chem, 1995. **270**(17): p. 9695-7.
118. Rogel, A. and E. Hanski, *Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22599-605.
119. Skinner, J.A., et al., *Bordetella type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1934-40.
120. Spensieri, F., et al., *Bordetella pertussis inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylate cyclase toxin-dependent cyclic AMP induction*. Infect Immun, 2006. **74**(5): p. 2831-8.

121. Khelef, N., P. Gounon, and N. Guiso, *Internalization of Bordetella pertussis adenylate cyclase-haemolysin into endocytic vesicles contributes to macrophage cytotoxicity*. Cell Microbiol, 2001. **3**(11): p. 721-30.
122. Magyar, T., et al., *The pathological effect of the Bordetella dermonecrotic toxin in mice*. Acta Vet Hung, 2000. **48**(4): p. 397-406.
123. Brockmeier, S.L., et al., *Role of the dermonecrotic toxin of Bordetella bronchiseptica in the pathogenesis of respiratory disease in swine*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 481-90.
124. Bishop, R.E., S.H. Kim, and A. El Zoeiby, *Role of lipid A palmitoylation in bacterial pathogenesis*. J Endotoxin Res, 2005. **11**(3): p. 174-80.
125. MacArthur, I., et al., *IEIIS Meeting minireview: Bordetella evolution: lipid A and Toll-like receptor 4*. J Endotoxin Res, 2007. **13**(4): p. 243-7.
126. Preston, A., et al., *Complete structures of Bordetella bronchiseptica and Bordetella parapertussis lipopolysaccharides*. J Biol Chem, 2006. **281**(26): p. 18135-44.
127. Caroff, M., et al., *Structural variability and originality of the Bordetella endotoxins*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(1): p. 63-8.
128. Ray, A., et al., *Variability in LPS composition, antigenicity and reactogenicity of phase variants of Bordetella pertussis*. FEMS Microbiol Lett, 1991. **63**(2-3): p. 211-7.
129. Harvill, E.T., et al., *Multiple roles for Bordetella lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6720-8.
130. Burns, V.C., et al., *Role of Bordetella O antigen in respiratory tract infection*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 86-94.
131. Pilione, M.R., et al., *pagP is required for resistance to antibody-mediated complement lysis during Bordetella bronchiseptica respiratory infection*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 2837-42.
132. Allen, A.G., et al., *Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus wlb from Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica*. Mol Microbiol, 1998. **29**(1): p. 27-38.
133. Mann, P.B., et al., *Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to Bordetella infection*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8144-52.
134. Coburn, B., I. Sekirov, and B.B. Finlay, *Type III secretion systems and disease*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 535-49.
135. Rosqvist, R., K.E. Magnusson, and H. Wolf-Watz, *Target cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells*. EMBO J, 1994. **13**(4): p. 964-72.
136. Yuk, M.H., E.T. Harvill, and J.F. Miller, *The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in Bordetella bronchiseptica*. Mol Microbiol, 1998. **28**(5): p. 945-59.
137. Fennelly, N.K., et al., *Bordetella pertussis expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses*. Infect Immun, 2008. **76**(3): p. 1257-66.
138. Gaillard, M.E., et al., *Laboratory Adaptation of Bordetella pertussis Is Associated with the Loss of Type Three Secretion System Functionality*. Infect Immun, 2011. **79**(9): p. 3677-82.

139. Nogawa, H., et al., *The type III secreted protein BopD in Bordetella bronchiseptica is complexed with BopB for pore formation on the host plasma membrane.* J Bacteriol, 2004. **186**(12): p. 3806-13.
140. Kuwae, A., et al., *BopB is a type III secreted protein in Bordetella bronchiseptica and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells.* Cell Microbiol, 2003. **5**(12): p. 973-83.
141. Kuwae, A., et al., *BopC is a novel type III effector secreted by Bordetella bronchiseptica and has a critical role in type III-dependent necrotic cell death.* J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6589-600.
142. Skinner, J.A., et al., *Bordetella type III secretion modulates dendritic cell migration resulting in immunosuppression and bacterial persistence.* J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4647-52.
143. Pilione, M.R. and E.T. Harvill, *The Bordetella bronchiseptica type III secretion system inhibits gamma interferon production that is required for efficient antibody-mediated bacterial clearance.* Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1043-9.
144. Weiss, A.A., et al., *Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in Bordetella pertussis vir-regulated genes.* Infect Immun, 1989. **57**(9): p. 2674-82.
145. Lacey, B.W., *Antigenic modulation of Bordetella pertussis.* J Hyg (Lond), 1960. **58**: p. 57-93.
146. Weiss, A.A. and S. Falkow, *Genetic analysis of phase change in Bordetella pertussis.* Infect Immun, 1984. **43**(1): p. 263-9.
147. Monack, D.M., et al., *Phase variants of Bordetella bronchiseptica arise by spontaneous deletions in the vir locus.* Mol Microbiol, 1989. **3**(12): p. 1719-28.
148. Herrou, J., et al., *Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in Bordetella.* PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6996.
149. Herrou, J., et al., *Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in Bordetella.* PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6996.
150. Cotter, P.A. and A.M. Jones, *Phosphorelay control of virulence gene expression in Bordetella.* Trends Microbiol, 2003. **11**(8): p. 367-73.
151. Williams, C.L. and P.A. Cotter, *Autoregulation is essential for precise temporal and steady-state regulation by the Bordetella BvgAS phosphorelay.* J Bacteriol, 2007. **189**(5): p. 1974-82.
152. Boucher, P.E., F.D. Menozzi, and C. Locht, *The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of Bordetella pertussis.* J Mol Biol, 1994. **241**(3): p. 363-77.
153. Boucher, P.E. and S. Stibitz, *Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of Bordetella pertussis.* J Bacteriol, 1995. **177**(22): p. 6486-91.
154. Karimova, G., J. Bellalou, and A. Ullmann, *Phosphorylation-dependent binding of BvgA to the upstream region of the cyaA gene of Bordetella pertussis.* Mol Microbiol, 1996. **20**(3): p. 489-96.
155. Steffen, P., S. Goyard, and A. Ullmann, *Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in Bordetella pertussis.* EMBO J, 1996. **15**(1): p. 102-9.

156. Roy, C.R. and S. Falkow, *Identification of Bordetella pertussis regulatory sequences required for transcriptional activation of the fhaB gene and autoregulation of the bvgAS operon*. J Bacteriol, 1991. **173**(7): p. 2385-92.
157. Scarlato, V., et al., *Positive transcriptional feedback at the bvg locus controls expression of virulence factors in Bordetella pertussis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6753-7.
158. Boucher, P.E., et al., *Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the Bordetella pertussis BvgA transcriptional activator at the fha promoter*. J Bacteriol, 1997. **179**(5): p. 1755-63.
159. Knapp, S. and J.J. Mekalanos, *Two trans-acting regulatory genes (vir and mod) control antigenic modulation in Bordetella pertussis*. J Bacteriol, 1988. **170**(11): p. 5059-66.
160. Martinez de Tejada, G., J.F. Miller, and P.A. Cotter, *Comparative analysis of the virulence control systems of Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica*. Mol Microbiol, 1996. **22**(5): p. 895-908.
161. Finn, T.M., R. Shahin, and J.J. Mekalanos, *Characterization of vir-activated TnphoA gene fusions in Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 3273-9.
162. Deora, R., et al., *Diversity in the Bordetella virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene*. Mol Microbiol, 2001. **40**(3): p. 669-83.
163. Nicholson, T.L., et al., *Microarray and functional analysis of growth phase-dependent gene regulation in Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4221-31.
164. Boucher, P.E., et al., *Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the fha promoter of Bordetella pertussis*. J Bacteriol, 2001. **183**(2): p. 536-44.
165. Boucher, P.E., et al., *The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 163-73.
166. Zu, T., et al., *Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of Bordetella pertussis directs promoter selectivity by RNA polymerase*. Mol Microbiol, 1996. **21**(3): p. 557-65.
167. Gross, R. and R. Rappuoli, *Positive regulation of pertussis toxin expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 3913-7.
168. Akerley, B.J., P.A. Cotter, and J.F. Miller, *Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the Bordetella-host interaction*. Cell, 1995. **80**(4): p. 611-20.
169. Merkel, T.J. and S. Stibitz, *Identification of a locus required for the regulation of bvg-repressed genes in Bordetella pertussis*. J Bacteriol, 1995. **177**(10): p. 2727-36.
170. Merkel, T.J., C. Barros, and S. Stibitz, *Characterization of the bvgR locus of Bordetella pertussis*. J Bacteriol, 1998. **180**(7): p. 1682-90.
171. Beattie, D.T., M.J. Mahan, and J.J. Mekalanos, *Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the vir-repressed genes (vrg genes) in Bordetella pertussis*. J Bacteriol, 1993. **175**(2): p. 519-27.

172. Merkel, T.J., et al., *Analysis of bvgR expression in Bordetella pertussis*. J Bacteriol, 2003. **185**(23): p. 6902-12.
173. Macnab, R.M., *Flagella and motility*, in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular microbiology*, F.C. Neidhart, et al., Editors. 1996, ASM Press: Washington D. C. p. 123-145.
174. Akerley, B.J. and J.F. Miller, *Flagellin gene transcription in Bordetella bronchiseptica is regulated by the BvgAS virulence control system*. J Bacteriol, 1993. **175**(11): p. 3468-79.
175. Savelkoul, P.H., et al., *Characterization of the fim2 and fim3 fimbrial subunit genes of Bordetella bronchiseptica: roles of Fim2 and Fim3 fimbriae and flagella in adhesion*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 5098-105.
176. Lopez-Boado, Y.S., L.M. Cobb, and R. Deora, *Bordetella bronchiseptica flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7525-34.
177. Tsuda, M., et al., *A urease-negative mutant of Helicobacter pylori constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3586-9.
178. Sangari, F.J., et al., *Characterization of the urease operon of Brucella abortus and assessment of its role in virulence of the bacterium*. Infect Immun, 2007. **75**(2): p. 774-80.
179. Burne, R.A. and Y.Y. Chen, *Bacterial ureases in infectious diseases*. Microbes Infect, 2000. **2**(5): p. 533-42.
180. McMillan, D.J., et al., *Molecular analysis of the bvg-repressed urease of Bordetella bronchiseptica*. Microb Pathog, 1996. **21**(5): p. 379-94.
181. McMillan, D.J., et al., *Expression of urease does not affect the ability of Bordetella bronchiseptica to colonise and persist in the murine respiratory tract*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **178**(1): p. 7-11.
182. Monack, D.M. and S. Falkow, *Cloning of Bordetella bronchiseptica urease genes and analysis of colonization by a urease-negative mutant strain in a guinea-pig model*. Mol Microbiol, 1993. **10**(3): p. 545-53.
183. Preston, A., et al., *Bordetella bronchiseptica PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract*. Mol Microbiol, 2003. **48**(3): p. 725-36.
184. van den Akker, W.M., *Lipopolysaccharide expression within the genus Bordetella: influence of temperature and phase variation*. Microbiology, 1998. **144 (Pt 6)**: p. 1527-35.
185. Ezzell, J.W., et al., *Phase-shift markers in the genus Bordetella: loss of cytochrome d-629 in phase IV variants*. Microbios, 1981. **31**(125-126): p. 171-81.
186. Junemann, S., *Cytochrome bd terminal oxidase*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1321**(2): p. 107-27.
187. Stubs, D., et al., *Identification and regulation of cold-inducible factors of Bordetella bronchiseptica*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 6): p. 1895-909.
188. Brickman, T.J., M.T. Anderson, and S.K. Armstrong, *Bordetella iron transport and virulence*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 303-22.

189. Brickman, T.J. and S.K. Armstrong, *Temporal signaling and differential expression of Bordetella iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators*. Biometals, 2009. **22**(1): p. 33-41.
190. Brickman, T.J. and S.K. Armstrong, *Bordetella pertussis fur gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated Bordetella bronchiseptica mutants*. J Bacteriol, 1995. **177**(1): p. 268-70.
191. Burgos, J.M., N.D. King-Lyons, and T.D. Connell, *Expression of BfrH, a putative siderophore receptor of Bordetella bronchiseptica, is regulated by iron, Fur1, and the extracellular function sigma factor EcfI*. Infect Immun, 2010. **78**(3): p. 1147-62.
192. Carter, G.R. and D.J. Wise, *Sources and transmission of infectious agents*, in *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*, G.R. Carter and D.J. Wise, Editors. 2004, Iowa state press, Blackwell publishing company. p. 59-64.
193. De Jong, M.F., *Diseases of Swine*. 6th ed, ed. B. Straw. 2006: Blackwell Publishing.
194. Merkel, T.J., et al., *Contribution of regulation by the bvg locus to respiratory infection of mice by Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1998. **66**(9): p. 4367-73.
195. Irie, Y., S. Mattoo, and M.H. Yuk, *The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in Bordetella bronchiseptica*. J Bacteriol, 2004. **186**(17): p. 5692-8.
196. Kirimanjeswara, G.S., et al., *The complex mechanism of antibody-mediated clearance of Bordetella from the lungs requires TLR4*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7504-11.
197. Guzman, C.A., et al., *Invasion and intracellular survival of Bordetella bronchiseptica in mouse dendritic cells*. Infect Immun, 1994. **62**(12): p. 5528-37.
198. Porte, F., J.P. Liautard, and S. Kohler, *Early acidification of phagosomes containing Brucella suis is essential for intracellular survival in murine macrophages*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 4041-7.
199. Alpuche Aranda, C.M., et al., *Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10079-83.
200. Steele-Mortimer, O., et al., *Vacuole acidification is not required for survival of Salmonella enterica serovar typhimurium within cultured macrophages and epithelial cells*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5401-4.
201. Fischer, H. and J.H. Widdicombe, *Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium*. J Membr Biol, 2006. **211**(3): p. 139-50.
202. Ng, A.W., A. Bidani, and T.A. Heming, *Innate host defense of the lung: effects of lung-lining fluid pH*. Lung, 2004. **182**(5): p. 297-317.
203. Fischer, H., J.H. Widdicombe, and B. Illek, *Acid secretion and proton conductance in human airway epithelium*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(4): p. C736-43.
204. Lardner, A., *The effects of extracellular pH on immune function*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(4): p. 522-30.
205. Foster, J.W. and H.K. Hall, *Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1991. **173**(16): p. 5129-35.
206. Foster, J.W. and H.K. Hall, *Adaptive acidification tolerance response of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1990. **172**(2): p. 771-8.

207. Koutsoumanis, K.P. and J.N. Sofos, *Comparative acid stress response of Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium after habituation at different pH conditions*. Lett Appl Microbiol, 2004. **38**(4): p. 321-6.
208. Yang, Y., et al., *Characterization of the Shewanella oneidensis Fur gene: roles in iron and acid tolerance response*. BMC Genomics, 2008. **9 Suppl 1**: p. S11.
209. Foster, J.W., *The acid tolerance response of Salmonella typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins*. J Bacteriol, 1993. **175**(7): p. 1981-7.
210. Sachs, G., et al., *Acid acclimation by Helicobacter pylori*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 429-38.
211. Lee, I.S., J.L. Slonczewski, and J.W. Foster, *A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1994. **176**(5): p. 1422-6.
212. Baik, H.S., et al., *The acid tolerance response of Salmonella typhimurium provides protection against organic acids*. Microbiology, 1996. **142 (Pt 11)**: p. 3195-200.
213. Bearson, B.L., L. Wilson, and J.W. Foster, *A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects Salmonella typhimurium against inorganic acid stress*. J Bacteriol, 1998. **180**(9): p. 2409-17.
214. Lin, J., et al., *Comparative analysis of extreme acid survival in Salmonella typhimurium, Shigella flexneri, and Escherichia coli*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4097-104.
215. Garcia-del Portillo, F., J.W. Foster, and B.B. Finlay, *Role of acid tolerance response genes in Salmonella typhimurium virulence*. Infect Immun, 1993. **61**(10): p. 4489-92.
216. Alonso-Hernando, A., C. Alonso-Calleja, and R. Capita, *Comparative analysis of acid resistance in Listeria monocytogenes and Salmonella enterica strains before and after exposure to poultry decontaminants. Role of the glutamate decarboxylase (GAD) system*. Food Microbiol, 2009. **26**(8): p. 905-9.
217. Stainer, D.W. and M.J. Scholte, *A simple chemically defined medium for the production of phase I Bordetella pertussis*. J Gen Microbiol, 1970. **63**(2): p. 211-20.
218. Lou, Y. and A.E. Yousef, *Adaptation to sublethal environmental stresses protects Listeria monocytogenes against lethal preservation factors*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(4): p. 1252-5.
219. Seputiene, V., et al., *Acid response of exponentially growing Escherichia coli K-12*. Microbiol Res, 2006. **161**(1): p. 65-74.
220. Porter, J.F., R. Parton, and A.C. Wardlaw, *Growth and survival of Bordetella bronchiseptica in natural waters and in buffered saline without added nutrients*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(4): p. 1202-6.
221. Preston, A. and D. Maskell, *The molecular genetics and role in infection of lipopolysaccharide biosynthesis in the Bordetellae*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(4): p. 251-61.
222. King, J.D., et al., *Post-assembly modification of Bordetella bronchiseptica O polysaccharide by a novel periplasmic enzyme encoded by wbmE*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1474-83.

223. Molloy, M.P., *Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients*. Anal Biochem, 2000. **280**(1): p. 1-10.
224. Olsson, I., et al., *Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension*. Proteomics, 2002. **2**(11): p. 1630-2.
225. Görg, A., et al., *Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis*. 2007: Technische Universität München.
226. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
227. Grove, H., et al., *Challenges related to analysis of protein spot volumes from two-dimensional gel electrophoresis as revealed by replicate gels*. J Proteome Res, 2006. **5**(12): p. 3399-410.
228. Meunier, B., et al., *Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis*. Anal Biochem, 2005. **340**(2): p. 226-30.
229. Hunt, S.M., et al., *Optimal replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics*. J Proteome Res, 2005. **4**(3): p. 809-19.
230. O'Driscoll, B., C. Gahan, and C. Hill, *Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Analysis of the Acid Tolerance Response in Listeria monocytogenes LO28*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(7): p. 2679-85.
231. Carrondo, M.A., *Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint*. EMBO J, 2003. **22**(9): p. 1959-68.
232. Chamnongpol, S., et al., *Fe(III)-mediated cellular toxicity*. Mol Microbiol, 2002. **45**(3): p. 711-9.
233. Wandersman, C. and P. Delepelaire, *Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores*. Annu Rev Microbiol, 2004. **58**: p. 611-47.
234. Chen, C.Y. and S.A. Morse, *Neisseria gonorrhoeae bacterioferritin: structural heterogeneity, involvement in iron storage and protection against oxidative stress*. Microbiology, 1999. **145 (Pt 10)**: p. 2967-75.
235. Velayudhan, J., et al., *The role of ferritins in the physiology of Salmonella enterica sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence*. Mol Microbiol, 2007. **63**(5): p. 1495-507.
236. Halsey, T.A., et al., *The ferritin-like Dps protein is required for Salmonella enterica serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence*. Infect Immun, 2004. **72**(2): p. 1155-8.
237. Lee, B.Y., M.A. Horwitz, and D.L. Clemens, *Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of Francisella tularensis*. Infect Immun, 2006. **74**(7): p. 4002-13.
238. Al-Mariri, A., et al., *Yersinia enterocolitica as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding Brucella abortus bacterioferritin or P39 antigen*. Infect Immun, 2002. **70**(4): p. 1915-23.
239. Brooks, B.W., et al., *Mycobacterium paratuberculosis antigen D: characterization and evidence that it is a bacterioferritin*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(8): p. 1652-8.

240. Tsolis, R.M., et al., *Fur regulon of Salmonella typhimurium: identification of new iron-regulated genes*. J Bacteriol, 1995. **177**(16): p. 4628-37.
241. Foster, J.W., *Salmonella acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response*. J Bacteriol, 1991. **173**(21): p. 6896-902.
242. Savitt, A.G., et al., *Francisella tularensis infection-derived monoclonal antibodies provide detection, protection, and therapy*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **16**(3): p. 414-22.
243. Al-Mariri, A., et al., *Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of Brucella spp*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6264-70.
244. Al-Mariri, A., et al., *Protection of BALB/c mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 4816-22.
245. Deshpande, R.G., et al., *Immunoaffinity chromatographic isolation of a high molecular weight seroreactive protein from Mycobacterium leprae cell sonicate*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995. **11**(3): p. 163-9.
246. Varghese, S., Y. Tang, and J.A. Imlay, *Contrasting sensitivities of Escherichia coli aconitases A and B to oxidation and iron depletion*. J Bacteriol, 2003. **185**(1): p. 221-30.
247. Tang, Y. and J.R. Guest, *Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by Escherichia coli aconitases*. Microbiology, 1999. **145 (Pt 11)**: p. 3069-79.
248. Pallen, M.J. and B.W. Wren, *The HtrA family of serine proteases*. Mol Microbiol, 1997. **26**(2): p. 209-21.
249. Jomaa, A., et al., *Characterization of the autocleavage process of the Escherichia coli HtrA protein: implications for its physiological role*. J Bacteriol, 2009. **191**(6): p. 1924-32.
250. Clausen, T., C. Southan, and M. Ehrmann, *The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate*. Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 443-55.
251. Baud, C., et al., *Role of DegP for two-partner secretion in Bordetella*. Mol Microbiol, 2009. **74**(2): p. 315-29.
252. Marchler-Bauer, A., et al., *CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D225-9.
253. Lehninger, A., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*. fifth edition ed. 2005: W. H. Freeman & Co.
254. Alvarez-Ordóñez, A., et al., *Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of Salmonella Typhimurium*. Int J Food Microbiol, 2010. **136**(3): p. 278-82.
255. Scott, D.R., et al., *Cytoplasmic histidine kinase (HP0244)-regulated assembly of urease with Urel, a channel for urea and its metabolites, CO₂, NH₃, and NH₄(+), is necessary for acid survival of Helicobacter pylori*. J Bacteriol, 2010. **192**(1): p. 94-103.
256. Eaton, K.A., et al., *Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in gnotobiotic piglets*. Infect Immun, 1991. **59**(7): p. 2470-5.

257. Bury-Mone, S., et al., *The Helicobacter pylori Urel protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation*. Mol Microbiol, 2001. **42**(4): p. 1021-34.
258. Scott, D.R., et al., *The role of internal urease in acid resistance of Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 1998. **114**(1): p. 58-70.
259. van Vliet, A.H., et al., *Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in Helicobacter pylori is mediated via a metal-responsive repressor cascade*. Infect Immun, 2004. **72**(2): p. 766-73.
260. Lee, J.S., et al., *Helicobacter pylori urease activity is influenced by ferric uptake regulator*. Yonsei Med J, 2010. **51**(1): p. 39-44.
261. Sangari, F.J., et al., *Brucella abortus ure2 region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 107.
262. Hensel, M., et al., *The genetic basis of tetrathionate respiration in Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1999. **32**(2): p. 275-87.
263. Barrett, E.L. and M.A. Clark, *Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate*. Microbiol Rev, 1987. **51**(2): p. 192-205.
264. Winter, S.E., et al., *Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella*. Nature, 2010. **467**(7314): p. 426-9.
265. Nicholson, T.L., *Construction and validation of a first-generation Bordetella bronchiseptica long-oligonucleotide microarray by transcriptional profiling the Bvg regulon*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 220.
266. Stenson, T.H., et al., *Bordetella pertussis risA, but not risS, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 5995-6004.
267. Gadda, G. and E.E. McAllister-Wilkins, *Cloning, expression, and purification of choline dehydrogenase from the moderate halophile Halomonas elongata*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(4): p. 2126-32.
268. Waditee, R., et al., *Isolation and functional characterization of N-methyltransferases that catalyze betaine synthesis from glycine in a halotolerant photosynthetic organism Aphanothece halophytica*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4932-42.
269. Maehara, A., et al., *A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA*. J Bacteriol, 2002. **184**(14): p. 3992-4002.
270. Thalen, M., et al., *Rational medium design for Bordetella pertussis: basic metabolism*. J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 147-59.
271. Banemann, A., H. Deppisch, and R. Gross, *The lipopolysaccharide of Bordetella bronchiseptica acts as a protective shield against antimicrobial peptides*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 5607-12.
272. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
273. Perez, J.C. and E.A. Groisman, *Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of Salmonella enterica*. Mol Microbiol, 2007. **63**(1): p. 283-93.
274. Gunn, J.S., *The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more*. Trends Microbiol, 2008. **16**(6): p. 284-90.

275. Guo, L., et al., *Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ*. Science, 1997. **276**(5310): p. 250-3.
276. Molloy, M.P., et al., *Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane*. Eur J Biochem, 2000. **267**(10): p. 2871-81.
277. Molloy, M.P., et al., *Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins*. Electrophoresis, 2001. **22**(9): p. 1686-96.
278. Pavkova, I., et al., *Comparative proteome analysis of fractions enriched for membrane-associated proteins from Francisella tularensis subsp. tularensis and F. tularensis subsp. holarctica strains*. J Proteome Res, 2006. **5**(11): p. 3125-34.
279. Molloy, M.P., *Isolation of bacterial cell membranes proteins using carbonate extraction*. Methods Mol Biol, 2008. **424**: p. 397-401.
280. McClelland, M., et al., *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 852-6.
281. O'Driscoll, B., C.G. Gahan, and C. Hill, *Adaptive acid tolerance response in Listeria monocytogenes: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(5): p. 1693-8.
282. Nelson, K.E., et al., *Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen Listeria monocytogenes reveal new insights into the core genome components of this species*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(8): p. 2386-95.
283. Teixeira-Gomes, A.P., A. Cloeckert, and M.S. Zygmunt, *Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in Brucella melitensis*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2954-61.
284. DeIvecchio, V.G., et al., *The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 443-8.
285. Hall, H.K. and J.W. Foster, *The role of fur in the acid tolerance response of Salmonella typhimurium is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition*. J Bacteriol, 1996. **178**(19): p. 5683-91.
286. Bijlsma, J.J., et al., *The Helicobacter pylori homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 606-11.
287. Mekalanos, J.J., *Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria*. J Bacteriol, 1992. **174**(1): p. 1-7.
288. Bouvier, G., et al., *Relationship between phagosome acidification, phagosome-lysosome fusion, and mechanism of particle ingestion*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(6): p. 729-34.
289. Cotter, P.A. and J.F. Miller, *A mutation in the Bordetella bronchiseptica bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens*. Mol Microbiol, 1997. **24**(4): p. 671-85.
290. McGowan, C.C., et al., *Acid-induced expression of an LPS-associated gene in Helicobacter pylori*. Mol Microbiol, 1998. **30**(1): p. 19-31.
291. Gancz, H., S. Censini, and D.S. Merrell, *Iron and pH homeostasis intersect at the level of Fur regulation in the gastric pathogen Helicobacter pylori*. Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 602-14.

292. Register, K.B. and M.R. Ackermann, *A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg⁺-phase swine isolates of Bordetella bronchiseptica grown under modulating conditions*. *Infect Immun*, 1997. **65**(12): p. 5295-300.
293. Wolfe, D.N., et al., *Comparative role of immunoglobulin A in protective immunity against the Bordetellae*. *Infect Immun*, 2007. **75**(9): p. 4416-22.
294. Laemmli, U.K., F. Beguin, and G. Gujer-Kellenberger, *A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation*. *J Mol Biol*, 1970. **47**(1): p. 69-85.
295. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
296. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
297. Gorg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. *Proteomics*, 2004. **4**(12): p. 3665-85.
298. Hoving, S., et al., *Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients*. *Proteomics*, 2002. **2**(2): p. 127-34.
299. Hoving, S., H. Voshol, and J.v. Oostrum, *Using ultra-zoom gels for high resolution two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis*, in *The proteomics protocol handbook*, J.M. Walker, Editor. 2005, Humana Press. p. 151-165.
300. Candiano, G., et al., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(9): p. 1327-33.
301. Weistmeier, R. and T. Naven, *In gel digestion*, in *Proteomics in practice*, R. Weistmeier and T. Naven, Editors. 2002, Wiley-VCH: Weinheim. p. 261-262.
302. Speicher, K.D., et al., *Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies*. *J Biomol Tech*, 2000. **11**(2): p. 74-86.
303. Gobom, J., et al., *Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics*. *Anal Chem*, 2001. **73**(3): p. 434-8.
304. Schuerenberg, M., et al., *Prestructured MALDI-MS sample supports*. *Anal Chem*, 2000. **72**(15): p. 3436-42.
305. Suckau, D., et al., *A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics*. *Anal Bioanal Chem*, 2003. **376**(7): p. 952-65.
306. Gevaert, K., et al., *Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(9): p. 1645-51.
307. Köster, C. and A. Holle. *A new intelligent annotation procedure: SNAP*. in *Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. 1999. Dallas, Texas, EEUU
308. Ding, Q., et al., *Unmatched masses in peptide mass fingerprints caused by cross-contamination: an updated statistical result*. *Proteomics*, 2003. **3**(7): p. 1313-7.
309. Perkins, D.N., et al., *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. *Electrophoresis*, 1999. **20**(18): p. 3551-67.

310. James, P., et al., *Protein identification by mass profile fingerprinting*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(1): p. 58-64.
311. Pappin, D.J., P. Hojrup, and A.J. Bleasby, *Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting*. Curr Biol, 1993. **3**(6): p. 327-32.
312. Casadio, R., P.L. Martelli, and A. Pierleoni, *The prediction of protein subcellular localization from sequence: a shortcut to functional genome annotation*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2008. **7**(1): p. 63-73.
313. Yu, N.Y., et al., *PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes*. Bioinformatics, 2010. **26**(13): p. 1608-15.
314. Valverde, C., D.F. Hozbor, and A. Lagares, *Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis*. Biotechniques, 1997. **22**(2): p. 230-2, 234, 236.
315. Tsai, C.M. and C.E. Frasch, *A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels*. Anal Biochem, 1982. **119**(1): p. 115-9.
316. Koressaar, T. and M. Remm, *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. Bioinformatics, 2007. **23**(10): p. 1289-91.
317. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
318. Mullis, K.B., *Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction*. Ann Biol Clin (Paris), 1990. **48**(8): p. 579-82.
319. Tung, W.L. and K.C. Chow, *A modified medium for efficient electrotransformation of E. coli*. Trends Genet, 1995. **11**(4): p. 128-9.
320. Sambrook, J. and T. Maniatis, *Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: Miniprep*, in *Molecular cloning. A laboratory manual*. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. Section 1.32.
321. Boyle, J.S. and A.M. Lew, *An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification*. Trends Genet, 1995. **11**(1): p. 8.